

Lambert-Eaton 筋無力症候群治療薬
3,4-diaminopyridine の
体内動態に関する研究

石田 奈津子

平成 26 年 1 月

博 士 論 文

Lambert-Eaton 筋無力症候群治療薬

3,4-diaminopyridine の

体内動態に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科
生命科学専攻
分子作用学講座

学 籍 番 号	1123032303
氏 名	石田 奈津子
主任指導教員名	松下 良 教授

目次

第1章	序論	1
第2章	ラットにおける 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) の体内動態の検討	
第1節	緒言	5
第2節	結果	7
第1項	3,4-DAP 静脈内投与時の薬物動態パラメータの検討	
第2項	3,4-DAP 単回経口投与時の薬物動態パラメータの検討	
第3節	考察	8
第3章	Lambert-Eaton 筋無力症候群患者における 3,4-DAP の体内動態の検討	
第1節	緒言	11
第2節	結果	12
第1項	患者背景	
第2項	血清中濃度推移および体内動態パラメータの検討	
第3項	3,4-DAP の薬理効果の検討	
第3節	考察	16
第4章	健常日本人における 3,4-DAP の体内動態の検討	
第1節	緒言	22
第2節	結果	23
第1項	被験者背景	
第2項	血清中濃度推移および体内動態パラメータの検討	
第3項	3,4-DAP の薬理効果の検討	
第4項	3,4-DAP の副作用の検討	
第5項	筋肉量、筋肉率との相関についての検討	
第3節	考察	25

第5章	食事が3,4-DAPの体内動態に与える影響の検討	
第1節	緒言	38
第2節	結果	39
第1項	ラットにおける食事が3,4-DAPの体内動態に及ぼす影響の検討	
第2項	健常人における食事が3,4-DAPの体内動態に及ぼす影響の検討	
第3項	ラットを用いた <i>in situ</i> での食事の影響の検討	
第3節	考察	41
第6章	結論	51
	謝辞	53
	実験の部	54
	参考文献	66

第1章 序論

Lambert-Eaton筋無力症候群（LEMS：Lambert-Eaton myasthenic syndrome）とは四肢近位筋の筋力低下，筋萎縮，易疲労性，反復運動による一時的な筋力の回復，深部腱反射の低下，自律神経障害などを特徴とする症候群であり^{1,2,3)}，有病率は10万人に1人とされる希少疾病であり，男女差はないと言われている^{1,4,5)}。本症候群の75～95%の患者においては，電位依存性 Ca^{2+} （カルシウムイオン）チャンネルに対する抗体（VGCCAb：voltage-gated calcium channels antibody）が検出される⁶⁻⁸⁾。本症候群はVGCCAbが神経筋接合部の前シナプス膜にある Ca^{2+} チャンネルを阻害することにより，ACh（アセチルコリン）の再取り込み，輸送に障害が生じ，その結果，AChのシナプス間への遊離障害が生じることにより発症すると考えられている⁷⁾。一方，重症筋無力症はACh受容体に対する抗体がシナプス後神経筋接合部にあるACh受容体を阻害することにより，神経筋伝達が阻害されることにより発症すると考えられているため，LEMSは発症原因が重症筋無力症とは異なる。LEMS患者の50～60%は肺小細胞がんなどの悪性腫瘍を合併する傍腫瘍性神経症候群である^{1,9,10)}が，悪性腫瘍を合併しない症例の存在も知られている。後者の症例では他の自己免疫疾患，例えば重症筋無力症や悪性貧血などを合併している場合が多く⁹⁾，LEMSの発症原因には多様な病態が関与すると考えられている。

治療に関しては，悪性腫瘍非合併群では副腎皮質ステロイド，免疫抑制薬，コリンエステラーゼ阻害薬，血漿交換療法，免疫グロブリン大量静注療法などが行われている。悪性腫瘍発症群では悪性腫瘍の治療が第一に行われ，補助的に前述したその他の治療が行われている。悪性腫瘍発症群では悪性腫瘍の治療に伴いLEMSの症状が寛解または改善することが多いが，悪性腫瘍非合併群では，前述した治療法を用いても十分な効果が得られないと言われている^{11,12,13)}。

LEMSの治療薬として 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) が効果的であるという報告は 1980 年代よりされている。3,4-DAPは、 K^+ （カリウムイオン）チャネル阻害剤であり、神経筋接合部の前シナプス膜にある膜電位依存性 K^+ チャネルを阻害することで、細胞膜の脱分極を引き起こし、膜電位依存性 Ca^{2+} （カルシウムイオン）チャネルを開口させ、細胞内への Ca^{2+} の流入を促進することによりシナプス末端からのAChの放出を促進する、という作用機序でLEMSの臨床症状を改善すると考えられている¹⁴⁻¹⁸⁾。さらに 3,4-DAPは Ca^{2+} チャネルへの直接作用も有するとの報告もある¹⁸⁾。3,4-DAPは現在欧米ではLEMSの治療の第一選択とされており^{11, 12, 19)}、2009 年 10 月には 3,4-DAP (amifampridine) phosphate (Firdapse[®], 旧名Zenas[®]) がLEMSに対するオーファンドラッグとしてEuropean Medicines Agency (EMA) より承認された。一方、日本では医薬品として認可されていないため、3,4-DAPの研究用試薬を治療に使用している。

3,4-DAPの薬効について、3,4-DAPをLEMSの治療に用いた症例報告^{11-13, 20-24)}やランダム化比較試験等の報告²⁵⁻²⁸⁾がようやく最近になって散見されるようになった。一方、3,4-DAPに関する体内動態に関しては、十分な検討が為されていない。ラットやイヌを用いた基礎検討も為されている^{29, 30-32)}が十分とはいえない。また、ヒトについては、Firdapse[®]の添付文書に相当するProduct informationのAnnex I - Summary of product characteristics²⁹⁾にヒト健常人における体内動態パラメータの記載がある他には、欧米人の多発性硬化症や重症筋無力症患者に対して 3,4-DAPを経口投与した際の血漿中濃度推移のみを報告したもの³³⁻³⁵⁾、オランダ人LEMS患者 1 例に 3,4-DAPを点滴静注した際の体内動態パラメータを報告したもの²⁶⁾しかなく、十分な解析もされていない。

従って、3,4-DAPの薬効や副作用をモニターする指標が定まっておらず、医師の経験による治療が施されているのが現状である。3,4-DAPは、一般的には経口で使用され、用量は 1 日 10～30 mg, 3～4 回に分割し開始され、その後必要に

応じて 1 日 100 mg 程度まで漸増するというものである^{11, 13)}。しかしながら至適な投与量や、有効血漿中濃度、中毒域、個体差については不明である。3,4-DAP の副作用としては口周囲・手指の異常感覚、腹痛・下痢等の消化器症状、喘息発作の誘発、痙攣が報告されており、また過量投与では不整脈の報告がある^{11 - 13, 30, 34 - 36)}。だがこれらの副作用について発症率や、投与量や血中濃度との因果関係についても不明である。さらに、長期投与により薬効が減少するという報告¹¹⁾もあるが、なぜ薬効が減少するのかも不明である。個体差については多発性硬化症の患者で 3,4-DAP を投与した時に最高血中濃度到達時間、半減期、投与量と血中濃度の関係が患者によって変動する³⁷⁾との報告があるが、なぜこのような個体差が出現するのかは不明であり、現状では、科学的根拠に基づいて適正に使用される状況が整っていない。

そこで本研究では、3,4-DAP の患者への安全で有効な使用方法の確立を目指し、3,4-DAP の薬物動態学的特徴を明らかにすることを目的とした。

まず第 2 章では、ラットに 3,4-DAP の静脈内および単回経口投与を行い、血清中濃度を経時的に測定することで、ラットにおける 3,4-DAP の血清中の半減期、分布容積などの体内動態パラメータ、バイオアベイラビリティ (F) の検討を行い、ヒト臨床試験のための基礎データを得ることとした。

ラットの薬物動態データを踏まえ、第 3 章以降では独立行政法人国立病院機構医王病院倫理委員会による審査を受け、承認を得た後、ヒトにおける 3,4-DAP の薬物動態について検討を行った。第 3 章では、日本人 LEMS 患者における経口投与時の 3,4-DAP の血清中濃度の測定を行い、測定データより薬物動態パラメータを算出した。

第 4 章では、日本人健常者を対象として臨床試験を行い、3,4-DAP の体内動態パラメータ、薬理効果および副作用について検討を行った。また個体間変動因

子として考えられる投与量依存性や筋肉量と体内動態パラメータとの関係について検討した。

第5章では、食事が3,4-DAPの体内動態に及ぼす影響を検討した。まず、日本人健常人およびラットにおいて食前および食後経口投与時の3,4-DAPの血清中濃度の測定を行い、薬物動態パラメータを算定し比較検討を行った。また、ラットを用いた *in situ* での検討を行った。

本論文は、これらの研究経過および結果を詳述し、考察を加えたものである。

第2章 ラットにおける 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) の体内動態の検討

第1節 緒言

3,4-DAPの薬物体内動態については、EMA製品情報²⁹⁾に記載がある他、多発性硬化症患者におけるBeverら⁷⁾による報告やKamaliら¹⁾による経口投与時の報告があり、動物においては、Goulay-Dufayら²⁾によるイヌを用いた経口投与時の報告がある。前者は薬物動態パラメータの算出は行われておらず、後者は半減期 ($T_{1/2}$)、最高血中濃度 (C_{max})、 C_{max} に達する時間 (T_{max})、クリアランス (CL_{tot}) / バイオアベイラビリティ (F)、分布容積 (Vd_{ss}) / F が推定されているのみである。また、最近報告された文献においては、3,4-DAPの点滴静注をLEMS患者へ行い、薬効コンパートメントを考慮して体内動態パラメータが算出されている²⁸⁾。LEMSは希少疾病であることから、ヒト、動物ともに、3,4-DAPの薬物動態、つまり $T_{1/2}$ 、 Vd_{ss} 、 CL_{tot} といった薬物動態パラメータについての情報は少なく、 F については情報がなく、明らかとなっていない。LEMSの患者に治療薬として 3,4-DAPを科学的根拠に基づき安全に使用するためには、ヒトにおける 3,4-DAPの変動因子を把握することが必要不可欠である。しかし、動物での体内動態についての情報がない状態で、ヒトにおいて臨床試験を行うことは望ましくない。

そこで本章では、3,4-DAPの薬物動態の特徴をとらえるためにラットを用いて体内動態実験を行った。第1項ではラットに 3,4-DAP 2 mg/kg を静脈内投与することによって得られた血清中 3,4-DAP の濃度推移をモーメント法で解析することにより、静脈内投与時の薬物動態パラメータの算出を行なった。第2項では、ラットに 3,4-DAP 10 mg/kg を経口投与し、得られた血清中 3,4-DAP 濃度推移をモーメント法で解析することにより、薬物動態パラメータの算出、単回静注時

の AUC（血中濃度－時間曲線下面積）と経口投与時の AUC を用いて F の検討を行なった。

第2節 結果

第1項 3,4-DAP 静脈内投与時の薬物動態パラメータの検討

3,4-DAP 2 mg/kg単回静脈内投与時の 3,4-DAPの血清中濃度推移をFig. 2-1 に示す。3,4-DAPの血清中濃度推移は最初の数分間に急激に減少し、以降は最初の数分間に比較すると明らかに減少しており、二相性を示していた。また、Fig. 2-1のデータを解析して得られた 3,4-DAPの $T_{1/2}$ は 15.9 ± 3.1 分、 CL_{tot} は 120 ± 23 mL/min/kg、 Vd_{ss} は 2.85 ± 0.73 L/kgであった (Table 2-1)。

第2項 3,4-DAP 単回経口投与時の薬物動態パラメータの検討

3,4-DAP 10 mg/kg単回経口投与時の 3,4-DAPの血清中濃度推移をFig. 2-2 に示す。3,4-DAPは 37.3 分に最高血清中濃度に到達した後減衰していた。また、Fig. 2-2のデータを解析して得られた 3,4-DAPの $T_{1/2}$ は 22.5 ± 4.1 分、 CL_{tot}/F は 480 ± 86 mL/min/kg、 Vd_{ss}/F は 27.6 ± 6.4 L/kgであった (Table 2-2)。第2項で行なった単回静注時のAUCと経口投与時のAUCより、ラットにおける 3,4-DAPのFは 0.246 ± 0.039 であった。

第3項 考察

ラットにおける 3,4-DAP 単回静注時の血清中濃度推移より求めた薬物動態パラメータから血清中における $T_{1/2}$ が 15.9 ± 3.1 分と短いこと、 $V_{d_{ss}}$ が 2.85 ± 0.73 L/kg と大きいことから、3,4-DAP は投与後数分間で体内の組織に分布し、平衡状態となり、血中から速やかに消失するのではないかと考えられる。

本研究において、ラットにおける 3,4-DAP の F は 0.246 ± 0.039 であることが示された。過去に F に関する報告がなく、3,4-DAP の F を算出した最初のものである。ヒトとラットでは代謝能に種差もあるので一概には言えないが、ヒトに静注を行ない、バイオアベイラビリティを算出することには困難が予想されるので貴重なデータと思われる。 F が 1 でないため、 F が個体間・個体内変動因子となる可能性が考えられる。Goulay-Dufay²⁾ によるイヌを用いた経口投与時の報告では $T_{1/2}$ は 113.6 分であり、ラットとイヌとの間で $T_{1/2}$ に大きな差がみられた。しかし、この報告では 1 匹のみでしかパラメータを算出しておらず、詳細な比較検討は難しいと思われる。

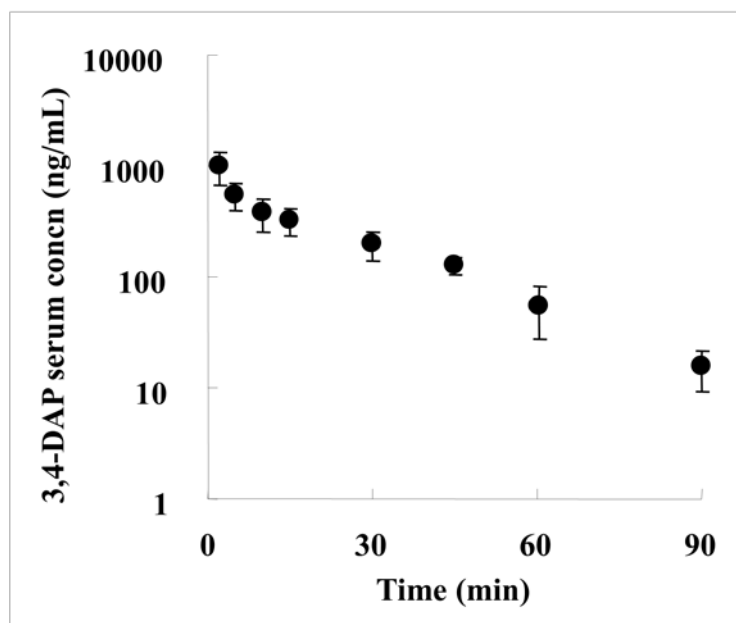


Fig. 2-1: Time course of 3,4-DAP serum concentration after 2 mg/kg intravenous administration in rats.

Each point is mean \pm S.D. (n = 7-11).

Table 2-1: Pharmacokinetic parameters of 3,4-DAP after 2 mg/kg intravenous administration in rats.

C(0) (ng/mL)	1108 \pm 242
AUC_{∞} (ng/mL \cdot min)	17171 \pm 3085
T_{1/2} (min)	15.9 \pm 3.1
MRT (min)	23.6 \pm 3.2
CL_{tot} (mL/min/kg)	120 \pm 23
Vd_{ss} (L/kg)	2.85 \pm 0.73

C(0) : 3,4-DAP plasma concentration at 0 min.

Each value is mean \pm S.D. (n = 11).

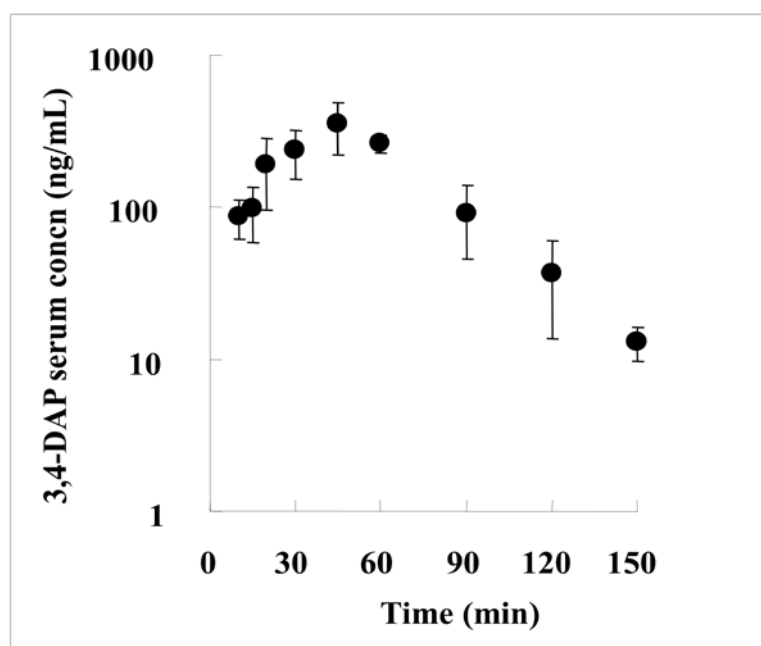


Fig. 2-2: Time course of 3,4-DAP serum concentration after 3,4-DAP 10 mg/kg oral administration.

Each point is mean \pm S.D. (n = 3).

Table 2-2: Pharmacokinetic parameters of 3,4-DAP after 10 mg/kg oral administration.

Tmax (min)	37.3 \pm 3.7
T_{1/2} (min)	22.5 \pm 4.1
MRT (min)	59.6 \pm 3.5
Cmax (ng/mL)	236.5 \pm 59.5
AUC_∞ (ng·min/mL)	21127 \pm 3772
CLtot/F (mL/min/kg)	480 \pm 86
Vdss/F (L/kg)	27.6 \pm 6.4
F	0.246 \pm 0.039

Each point is mean \pm S.D. (n = 3).

第3章 LEMS 患者における 3,4-DAP 血清中濃度推移と薬物動態パラメータ

第1節 緒言

第2章で行なった動物実験により、ラットにおける 3,4-DAP の体内動態に関する情報を得ることができた。そこで、次にヒトにおける臨床試験に移ることとした。本邦において、3,4-DAP 服用患者の血清中濃度測定の結果はない。本研究では、医王病院に通院中の 3,4-DAP 服用中 LEMS 患者に文書同意を得て、3,4-DAP の血清中濃度を測定し、その結果より薬物動態パラメータを算出した。また、投与前と投与後の患者の状態についての評価を行なった。

本試験は国立病院機構医王病院にて実施した。本実施するにあたり、事前に独立行政法人国立病院機構医王病院倫理委員会における審査を受け、承認を得た後に実施された。また、被験者に対しては、試験前に内容について十分な説明を受け、試験への参加に文書による同意を得た。

第2節 結果

第1項 患者背景

患者背景を以下に示すとともに、LEMS 治療薬の服薬歴を Fig. 3-1 に示す。

症例：57 歳 女性 身長：153 cm 体重：46.8 kg

病名：Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS), non-paraneoplastic

主訴：四肢筋力低下，歩行障害，易疲労性，感覚鈍磨

合併症：後縦靱帯骨化症（OPLL；C1-3），高血圧，脂質異常症

既往歴：特記事項なし

家族歴：特記事項なし

生活歴：飲酒なし，喫煙なし

現病歴：

1994 年 7 月頃から両下肢が重だるく，意識的に力をいれないと歩けないなどの歩行障害および，上肢のだるさが出現した。8 月頃から正座の後のような四肢のしびれが出現したため，近医整形外科受診。頸部 OPLL と診断，薬物治療にて症状一旦改善するも 9 月頃から再び出現。徐々に歩行障害進行し，階段昇降・平地でもすり足になり，9 月 6 日金沢大学附属病院神経内科受診し，LEMS と診断される。二重膜濾過法による血漿交換療法（DEPP），プレドニゾロン・アザチオプリン内服，グルコン酸カルシウム静注などを行い，2000 年 3 月 1 日より 3,4-DAP 30 mg の内服開始。その後は 20～60 mg で投与量調整され，現在は 55 mg を内服している。

- 2007/12/20 発熱（急性咽頭炎疑い，他院より風邪薬処方あり）後より筋力低下を認める。（近位筋を中心に徒手筋力検査法（MMT）1/2～1 のグレード低下）
- 3,4-DAP 増量（45→60 mg），ジスチグミン増量（5→10 mg）
- セフポドキシムプロキセチル（CPDX-PR）他服用
- 2007/ 1/ 8 筋力改善し，ほぼ悪化前のレベルからやや改善
- 2008/ 3/ 4 2week 前から調子良いため，自己判断でジスチグミンを 5 mg にしていた。筋力改善認めるため，3,4-DAP を 45 mg に減量
- ジスチグミンも 5 mg に減量（その後は時々 5 mg 追加服用）
- 2008/ 5/ 1 2week 前からプレドニゾロンを 7 mg 毎日から 7 mg/6 mg 隔日に減量
- 2008/ 7/15 2 日前から微熱あり，マイコプラズマ肺炎と診断。CAM 他服用
- この時は明らかな筋力低下認めず
- 2008/ 9/11 2~3week 前には咳嗽（マイコプラズマ肺炎後による）消失
- 2008/10/ 9 顔の違和感・しびれ感を自覚。右半身・両下肢にもしびれ感あり。
- MRI にて後縦靱帯骨化症（C1-3）によるものと診断
- 2009/ 1/15 プレドニゾロン 6 mg に減量
- 2009/ 2/ 3 一過性筋力低下・膝折れ等認めたため，プレドニゾロン 7 mg に増量
- 2009/ 4/ 2 筋力・易疲労性に改善認めないため，3,4-DAP を 55 mg に増量
- 2009/ 4/ 9 服用タイミングによって薬の効果違うと話される。徐々に筋力は改善
- 2009/ 8/27 薬物動態測定

服用中薬剤：

プレドニゾロン錠	1 回 7 mg (1 日 7 mg)
カンデサルタン シレキセチル錠	1 回 8 mg (1 日 8 mg)
イトブリド錠	1 回 50 mg (1 日 50 mg)
アスピリン錠	1 回 100 mg (1 日 100 mg)
ジスチグミン臭化物錠	1 回 5 mg (1 日 5 mg) 1 日 1 回 朝食後
テプレノンカプセル	1 回 50 mg (1 日 100 mg) 1 日 2 回 朝夕食後
アトルバスタチン Ca 錠	1 回 20 mg (1 日 20 mg) 1 日 1 回 夕食後
沈降炭酸カルシウム	1 回 1 g (1 日 3 g) 1 日 3 回 朝昼夕食前

3,4-DAP 服用量：1 回 18.3 mg (1 日 55 mg) 1 日 3 回 朝昼夕食後

最終服用時間：前日の 18：30

朝食：6:00 過ぎ

採血時間：投与前 60, 30 分, 投与直前, 投与後 10, 15, 20, 30, 60, 120 分

第2項 血清中濃度推移および体内動態パラメータの検討

症例 57 歳女性の LEMS 患者について、3,4-DAP 18.3 mg 経口投与後の血清中 3,4-DAP 濃度を測定した。3,4-DAP 18.3 mg 経口投与時の血清中濃度推移のグラフを Fig. 3-2 に、また、Fig. 3-2 のデータを解析して得られた 3,4-DAP の薬物動態パラメータを Table 3-1 に示す。3,4-DAP 投与前 60 分と投与直前の血清中濃度は測定限界以下 (<1.57 ng/mL) であった。血清中濃度は 15 分で最大となり、その後は減少した。この患者の 3,4-DAP の半減期は 40.0 分であった。

第3項 3,4-DAP の薬理効果の検討

3,4-DAP 投与前と投与後の患者の効果に関するデータである自覚症状、他覚所見、握力、CMAP (compound muscle action potential, 複合筋活動電位) を Table 3-2 に示す。投与前に比べ、投与後で自覚症状、他覚所見の改善が見られた。自覚症状は服用後 30 分よりも 60 分で改善し、服用後 110 分経過しても改善は持続していた。握力では 0.5~2.0 kg の改善がみられた。CMAP に関しては変化がみられなかった。

第3節 考察

症例 57 歳女性のLEMS患者での 3,4-DAPの血清中半減期は 40.0 分であり、Beverら⁷⁾が報告している経口投与のデータから我々が算出した $T_{1/2}$ である 70.2 分 (37.3~129.8) より短かった。

血清中濃度測定結果より、投与前 60 分と、投与直前での血清中濃度は測定限界以下 (<1.57 ng/mL) であった。最終服用時刻が前日の 18:30 であり、服用してから投与直前まで 15 時間 55 分経過していることになる。この患者の 3,4-DAP の $T_{1/2}$ が 40.0 分で毎回同じ濃度推移をすると仮定すると、投与後 120 分以降には定量限界以下になると推定され、我々が測定して得た服用前の血清中濃度が定量限界以下であることと矛盾しないと思われる。

投与前と投与後の患者の状態を比較した場合、自覚症状は投与後 30 分には改善しており、60 分、110 分と経過するごとに改善し、また、他覚所見も投与後 110 分では改善し、握力も 0.5~2 kg の改善が見られた。このことから 3,4-DAP 投与によって患者自身でも感じられる程度の症状の改善が現れていることがわかった。しかし、CMAP では手関節・肘部刺激の場合、反復刺激の場合ともに変化がみられなかった。

今回の採血点での最高血清中濃度は 3,4-DAP服用後 15 分となり、その後の血清中濃度は減少した。しかし、自覚症状は服用後 30 分よりも 60 分で改善し、服用後 110 分経過しても自覚症状の改善は持続していた。ラットにおいて 3,4-DAP単回静注後、徐々に筋収縮力が増加し効果が持続していたという報告¹⁸⁾ やLEMS患者に 3,4-DAP 10 mgを 1 時間かけて点滴静注し、その後の筋収縮力などを測定したが、3,4-DAPの血清中濃度が低下しているにもかかわらず、効果は持続し、3,4-DAPの血清中濃度と効果との関係にはヒステリシス (anti clockwise) が生じていたという報告²⁸⁾ がある。今回我々が経口投与により得たデータも血

清中濃度が低下しているにもかかわらず、効果は持続していた。これには①3,4-DAPの神経筋接合部への移行および消失速度が遅いこと、②3,4-DAPの代謝物が効果を持っていること、③ある血清中濃度を越えないと効果が現れない閾値のようなものが存在していることが考えられるが、詳細は不明であり、今後の解明が望まれる。

3,4-DAP 40 mgを経口投与した文献⁷⁾では、論文中に CL_{tot}/F 、 Vd_{ss}/F の記述はないが、その血清中濃度推移より我々が算出した薬物動態パラメータは CL_{tot}/F が 630 L/hr、 Vd_{ss}/F が 699 L であり、今回のLEMS患者のデータを単位換算すると CL_{tot}/F が 1284 L/hr、 Vd_{ss}/F が 1405 Lとなる。この値と比較すると今回の患者のパラメータ、 CL_{tot}/F 、 Vd_{ss}/F は、ともに 50 %程度である。これにはFの違いによる可能性が考えられる。この文献では食後に3,4-DAPの経口投与を行なったが、この患者では空腹時の結果であり、食事によりFに変化が起これ、吸収が改善するのかもしれない。しかし、Sandersら⁶⁾は、3,4-DAPの空腹時の投与によって口周りの異常感覚といった副作用が著しいのかもしれないと述べている。このことから、空腹時投与の方が吸収が良く副作用が出現した可能性が考えられる。また、長期投与に伴いFの低下が起きている可能性も考えられる。矢部ら¹⁹⁾は本邦の非担癌性LEMS患者3例において、いずれの症例も経過観察中に薬効時間の短縮を認め、服薬量の増量や分割投与が必要であったと述べている。この一因として吸収の低下などが考えられ、詳細な検討が望まれる。

T_{max} に違いが認められたことについては種差による影響が考えられる。しかし、Aisenら³¹⁾が報告している筋萎縮性側索硬化症患者では、 T_{max} は 1.0 ± 0.5 時間であり、また、Beverら⁷⁾が報告している多発性硬化症 (MS) 患者では 20~60 分であり、LEMS患者において動態が変化しているのかもしれない。また、本患者は空腹時の投与であったが、これらの報告ではどちらも食事の後に3,4-DAPを経口投与しているため、 T_{max} の変動に食事の影響が考えられた。

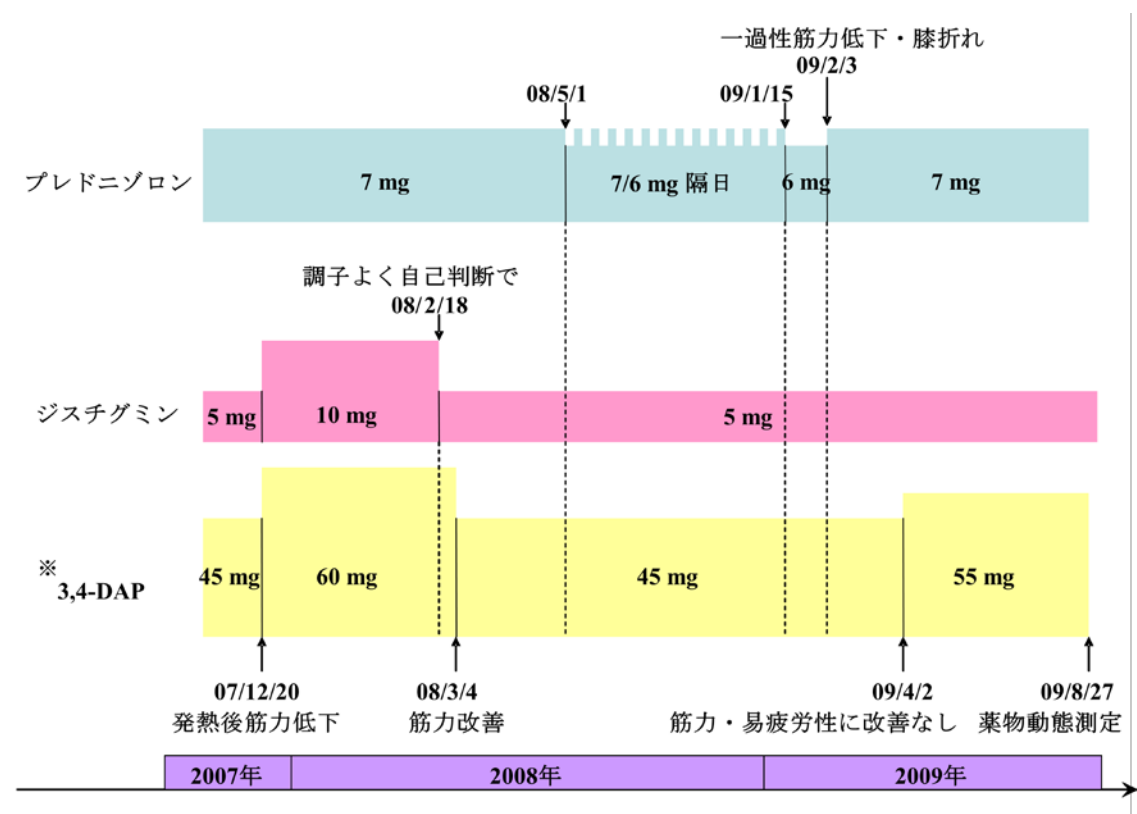


Fig. 3-1: Clinical course of the LEMS patient

※ 2000 年 3 月 1 日より 30 mg で開始し、20～60 mg で投与量調節された

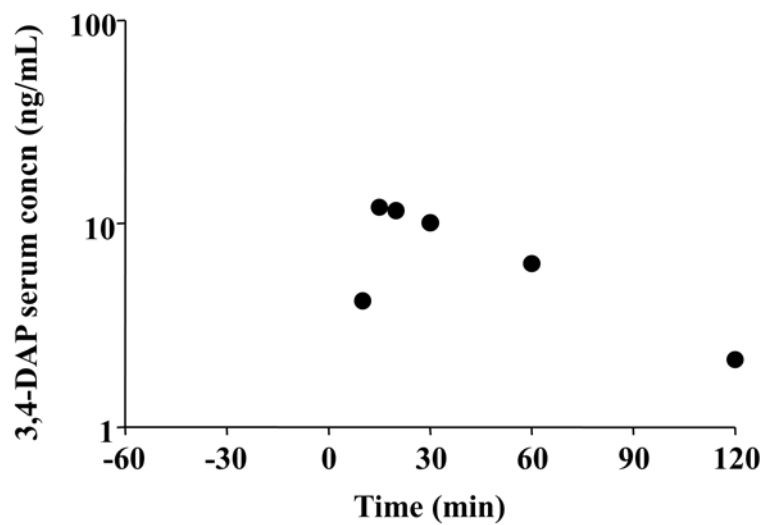


Fig. 3-2: Time course of 3,4-DAP serum concentration after 18.3 mg oral administration in the LEMS patient※.

※ BW: 46.8 kg, age: 57 years, sex: female

Table 3-1: Pharmacokinetic parameters of 3,4-DAP after 18.3 mg oral administration in the LEMS patient.

T_{\max} (min)	15
$T_{1/2}$ (min)	40.0
MRT (min)	66.3
C_{\max} (ng/mL)	12.04
AUC_{∞} (ng·min/mL)	856
CL_{tot}/F (mL/min/kg)	457
Vd_{ss}/F (L/kg)	30.0

第4章 健常日本人における 3,4-diaminopyridine の体内動態の検討

第1節 緒言

3,4-DAP について体内動態検討を実施するためには、LEMS は希少疾患であるため、患者数がなかなか集まらないという問題がある。欧米人を対象とした臨床試験は散見されるが、日本人 LEMS 患者を対象とした臨床試験は我々が第3章で報告した一症例のみである。一方でこれまで日本人の健常者における 3,4-DAP の体内動態報告はない。そこで本章では健常日本人を対象とした臨床試験を行い、3,4-DAP のヒトでの体内動態的特徴を明らかにすることを目的とした。3,4-DAP の投与量依存性を検討するために、投与量は 10 mg および 20 mg として、投与量と血清中濃度の関係、血清中濃度と薬理効果や副作用との関係についての検討を行った。また 3,4-DAP の作用部位と考えられる筋肉量と薬理効果や体内動態パラメータとの関係についても検討した。

本試験は国立病院機構医王病院にて実施した。本実施するにあたり、事前に独立行政法人国立病院機構医王病院倫理委員会における審査を受け、承認を得た後に実施された。また、被験者に対しては、試験前に内容について十分な説明を受け、試験への参加に文書による同意を得た。

第2節 結果

第1項 被験者背景

Table 4-1 に被験者 5 名の背景を示す。24～26 歳の日本人男性 5 名を対象として行われた。体重および体脂肪率から算出した筋肉量は 15.2～25.3 kg であった。臨床試験時に体温や血圧、脈拍に異常値を示す者はおらず、また 5 名とも持病や併用薬はなく、過去 1 年の血液、尿検査で異常値を認めていなかった。

第2項 健常人における 3,4-DAP の血清中濃度推移および体内動態パラメータの検討

5 名の健常日本人男性について、3,4-DAP を 10 mg および 20 mg 経口投与後の 3,4-DAP の血清中濃度推移の結果を Fig. 4-1 に、また、Fig. 4-1 のデータを解析して得られた 3,4-DAP の薬物動態パラメータを Table 4-2 に示す。3,4-DAP 10 mg 投与時の血清中濃度は 37 ± 22 分で最大となり、その後は減少した。T_{1/2} は 54.4 ± 28.7 分であった。CL_{tot}/F は 262 ± 56 mL/min/kg、Vd/F は 27 ± 15 L/kg となった。3,4-DAP 20 mg 投与時の血清中濃度は 39 ± 20 分で最大となり、その後は減少した。T_{1/2} は 35.4 ± 13.2 分であった。CL_{tot}/F は 220 ± 204 mL/min/kg、Vd/F は 12 ± 10 L/kg となった。

第3項 3,4-DAP の薬理効果の検討

3,4-DAP の薬理作用を検討するために、神経伝導検査を行った。3,4-DAP 服用前に各パラメータに異常値を示す者はいなかった。3,4-DAP 20 mg 投与後の各パラメータの変化を Table 4-3 に示した。CMAP, MCV (motor nerve conduction velocity, 神経伝導速度) について、Fig. 4-2 のとおり、3,4-DAP 服用前および服用後 20 分後, 90 分後においていずれも正常域内で有意な変化は見られず、薬理作用は判定できなかった。

第4項 3,4-DAP の副作用の検討

3,4-DAP の副作用を検討するために、心電図検査を行った。自動解析による結果を Table 4-4 に示した。自動解析の結果より、臨床上問題にはならない程度ではあるが、心電図の波形に異常が見られた (No.4 第1度房室ブロック)。Fig. 4-3 に心拍数, PR 間隔, QRS 幅, QTc 間隔の変化を示した。PR 間隔は 3,4-DAP 投与により正常範囲内ではあるが全例で延長した。

第5項 筋肉量, 筋肉率との相関についての検討

Fig. 4-4 に AUC_{∞} /投与量 (D), $T_{1/2}$, Vd/F との関係をそれぞれ示した。10 mg, 20 mg 服用時それぞれで相関を取ると、筋肉量が多いほど、 AUC_{∞}/D は小さくなる傾向が見られた。 $T_{1/2}$, Vd/F については相関が見られなかった。

第3節 考察

24～26歳の健常日本人男性5名を対象として、3,4-DAPの体内動態特性を明らかにする目的で臨床試験を行った結果、3,4-DAP 10 mg投与時のVd/Fは 27 ± 15 L/kgと大きく、また $T_{1/2}$ は 54.4 ± 28.7 分と短いことがわかった。第3章でLEMS患者に3,4-DAP 18.3 mg空腹時に経口投与して得られたVd/Fは30.0 L/kg、 $T_{1/2}$ は40分と今回の結果と同等であり、3,4-DAPは速やかに血清中から消失するが組織への移行性は良い薬物であることが明確になった。また第2章で報告したとおり、絶食処置したラットに3,4-DAP 10 mg/kg経口投与後の血清中濃度データから得られたVd/Fは 7.20 ± 1.60 L/kg、 $T_{1/2}$ は 33.0 ± 5.3 分であり、Vd/Fが1より大きいことつまり組織移行性が高いことや、 $T_{1/2}$ が1時間以下と消失が早いことはラットでもヒトでも一致した。しかしながら食事の影響によりパラメータが変動する可能性があるため、次章で食事の影響を検討することとした。

3,4-DAP 20 mg投与時には10 mg投与時と比較して、最高血清中濃度 およびAUCは3～4倍となり、3,4-DAPが非線形性薬物である可能性が示唆された。一方投与量を増やすとVd/Fに低下が見られた原因としては、投与量を上げることで分布過程に飽和が生じた可能性が示唆される。投与量依存性について更なる検討を行うために、過去の報告例と比較した。欧米人のMS患者4例³⁵⁾、第3章の日本人LEMS患者1例、本章の日本人健常人5例について、投与量とAUC、Vd/F、 $T_{1/2}$ 、 CL_{tot}/F との関係性をFig. 4-5に示した。なお、体内動態パラメータが算出されていない報告については、血中濃度データをグラフから読み取り計算した。投与量とAUCには比例関係が見られ、MS患者では投与量依存性がないような傾向が見られ更なる検討が必要である。しかし健常人においてさらに投与量を増やして検討することは難しいと考えられる。 $T_{1/2}$ および CL_{tot}/F についてはほぼ一定した値をとることが読み取れる。一方、今回の臨床試験の対象者5では CL_{tot}/F

が他の対象者と比較して高い傾向が見られ、対象者 5 には 3,4-DAP の吸収を妨げる要因があるのかもしれない。

Firdapse[®] は 3,4-DAP のリン酸塩製剤であり F が 0.93 ~ 1 と本研究で使用了 3,4-DAP に比べて F は約 4 倍であるとされているが、詳細は不明である。Firdapse[®] Product information (Annex I - Summary of product characteristics)²⁹⁾ における健康人に 3,4-DAP 20mg 投与した場合の体内動態パラメータは、 $T_{1/2}$ 136.8 ± 42.24 分、 T_{max} 78.6 ± 52.8 分と、今回算出された日本人健康人における体内動態パラメータと比較してやや長かった。一方、 C_{max} は 40.6 ± 31.3 ng/mL、AUC は 6540 ± 4602 ng/mL/min であり、AUC は今回の日本人健康人における検討結果の約 3 倍であった。動物実験の結果からすると、今回用いた 3,4-DAP が酸であるのに対して、Firdapse[®] がリン酸塩であることが F の差につながったことが一因かもしれない。しかし、 $T_{1/2}$ にも差が認められることからその他の影響も考えられる。

3,4-DAP の薬理作用の検討のために神経伝導検査を行ったが、服用後 20 分後でも 90 分後でも神経伝導検査のパラメータに変化は見られなかった。健康人であるため元から神経伝導検査のパラメータが正常であり、病態下で神経伝導検査のパラメータの遅延等が生じる場合の検討が必要だと思われる。しかし 20 mg を超えた投与量では副作用発現の可能性もあるため、健康人で投与量と効果の関係性について検討することは難しいことがわかった。血清中濃度と効果の発現にずれがあるとの報告もあるが、健康人であるためこれについても検討できなかった。

3,4-DAP の副作用の検討のために心電図検査を行った。正常範囲内での PR 間隔の延長が見られたが、小児循環器専門医により、いずれの被験者においても臨床上問題とならないと判断された。また、1 名で臨床上問題とならないものの自動判定において服用後に第 1 度の房室ブロックと判定された。この結果から 3,4-DAP が房室結節に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。これま

でも、3,4-DAPの副作用として不整脈が報告されている³⁸⁾。一方、欧州製品情報²⁹⁾で指摘されているQT延長は本研究では認められなかった。

筋肉量と体内動態パラメータとの相関を検討すると、筋肉量が多いほど、AUC_{∞/D}は低くなるという傾向が見られた。このことから長期臥床などにより筋肉量が低下した場合、3,4-DAPの血中濃度が上昇する可能性があると考えられた。一方でVd/Fについては筋肉量との相関は見られなかった。また、今回検討した対象者は筋肉率では37.4～42.4%と健常人男性の平均31.0～34.9%と比較して、筋肉質である集団であり、また筋肉量に大きなばらつきが見られなかったため、正しく評価されていない可能性にも注意する必要があるため、筋肉量の変動が大きい、より多くの母集団での検討が望まれる。

日本人健常人のデータおよび、第3章の日本人LEMS患者（1人あたりの投与量18.3 mg）、欧米人MS患者（投与量30～90 mg）³⁵⁾、欧米人重症筋無力症患者（投与量10 mg）³³⁾、第2章のWistarラット（投与量2.5 mg）、SDラット（投与量2.5 mg）⁴¹⁾、イヌ（投与量7.9 mg）³¹⁾の報告をもとに、体重とCL/FおよびVd/Fの関係を示し、種差について検討したものがFig. 4-6である。ラットについてはSDラットでもWistarラットでも同等な結果が得られた。CL/Fについては、イヌのみが直線から外れている傾向が見られる。これまで種差の検討や*in vivo*において3,4-DAPの代謝や排泄についての報告はないが、SDラット、イヌ、サル、がん患者の肝ミクロソームを用いた*in vitro*で3,4-DAPの代謝について検討した報告¹⁶⁾によると、イヌのみが他の種と異なりCYPで代謝されなかったとされており、イヌのCL/Fが他の種と比較して低値を示した結果と一致したが、種差については更なる検討が望まれる。

Table 4-1: Characteristics of healthy volunteers.

No. of volunteer	1	2	3	4	5	Mean \pm S.D.
Age	25	26	24	24	24	24.6 \pm 0.9
Sex	Male	Male	Male	Male	Male	—
Height (min)	164.4	173.0	172.0	167.5	171.5	169.7 \pm 3.6
Weight (kg)	54.4	58.1	81.0	60.0	66.5	64.0 \pm 10.5
Body fat percentage (%)	15.2	15.6	25.3	20.1	16.5	18.5 \pm 4.2
Muscle weight (kg)	23.5	24.5	30.3	24.0	27.8	26.0 \pm 2.9
Muscle percentage (%)	42.4	42.1	37.4	40.0	41.8	40.7 \pm 2.1

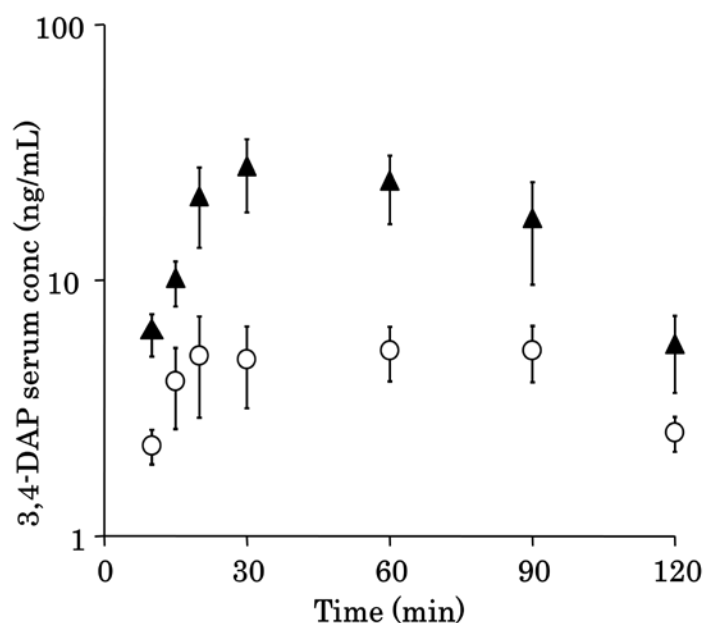


Fig. 4-1: Time courses of 3,4-DAP serum concentrations after oral administration of 10 mg or 20 mg to healthy volunteers.

Each point is mean \pm S.D. (n = 5).

○: Dose 10 mg, ▲: Dose 20 mg

Table 4-2: Pharmacokinetics parameters of 3,4-DAP after oral administration of 10 mg or 20 mg to healthy volunteers.

Dose	10 mg	20 mg
T_{max} (min)	37 ± 22	39 ± 20
$T_{1/2}$ (min)	54.4 ± 28.7	23.6 ± 7.7 *
C_{max} (ng/mL)	8.09 ± 4.47	35.8 ± 15.7
AUC_t (ng·min/mL)	432 ± 250	1924 ± 932
AUC_{∞} (ng·min/mL)	639 ± 213	2097 ± 936
CL_{tot}/F (mL/min/kg)	262 ± 56	220 ± 204
Vd_{ss}/F (L/kg)	27 ± 15	12 ± 10

Each value is mean \pm S.D. (n = 5, *P < 0.05).

Table 4-3: Changes in the electromyography (EMG) examination in healthy volunteers after 3,4-DAP administration.

No. of volunteer			10 mg			20 mg		
			before	20 min	90 min	before	20 min	90 min
1	Wrist	Lat. (ms)	3.5	3.4	3.2	2.8	3.0	2.8
		Amp. (mV)	11.2	10.6	11.2	7.7	8.6	8.1
	Elbow	Lat. (ms)	8.2	8.4	7.7	7.3	7.6	7.4
		Amp. (mV)	10.3	11.1	10.6	7.3	8.3	7.8
	Wrist-Elbow	NCV (m/s)	57.3	53.0	59.1	63.3	61.2	62.4
2	Wrist	Lat. (ms)	3.6	3.9	3.6	3.5	3.6	3.6
		Amp. (mV)	8.5	7.9	8.1	6.3	6.0	6.2
	Elbow	Lat. (ms)	7.6	8.0	7.7	8.0	7.9	7.8
		Amp. (mV)	7.4	7.1	7.9	6.3	5.9	6.0
	Wrist-Elbow	NCV (m/s)	59.2	57.8	59.0	64.5	67.1	67.5
3	Wrist	Lat. (ms)	4.0	4.0	4.1	3.6	3.7	3.7
		Amp. (mV)	28.5	27.4	26.1	11.7	10.7	11.4
	Elbow	Lat. (ms)	8.3	8.3	8.2	8.1	8.4	8.3
		Amp. (mV)	27.2	26.7	26.6	11.8	10.8	11.5
	Wrist-Elbow	NCV (m/s)	58.1	58.5	60.2	62.3	59.0	60.6
4	Wrist	Lat. (ms)	3.1	3.1	3.1	3.0	2.9	2.9
		Amp. (mV)	8.2	7.2	6.8	7.8	7.9	8.4
	Elbow	Lat. (ms)	7.6	7.6	7.6	7.6	7.4	7.6
		Amp. (mV)	7.7	6.8	6.3	8.0	7.9	8.3
	Wrist-Elbow	NCV (m/s)	59.4	59.1	61.2	62.2	64.5	62.0
5	Wrist	Lat. (ms)	2.7	2.8	2.7	3.0	3.3	2.9
		Amp. (mV)	10.1	9.6	9.2	10.7	11.4	10.9
	Elbow	Lat. (ms)	7.1	7.1	7.0	7.6	7.7	7.2
		Amp. (mV)	9.8	9.4	9.1	10.6	12.0	10.9
	Wrist-Elbow	NCV (m/s)	62.1	63.3	63.0	65.9	66.2	68.9

Lat: Latency is the time it takes for the stimulus to reach the recording electrodes.

Amp: Amplitude of muscle contraction

NCV: Nerve conduction velocity

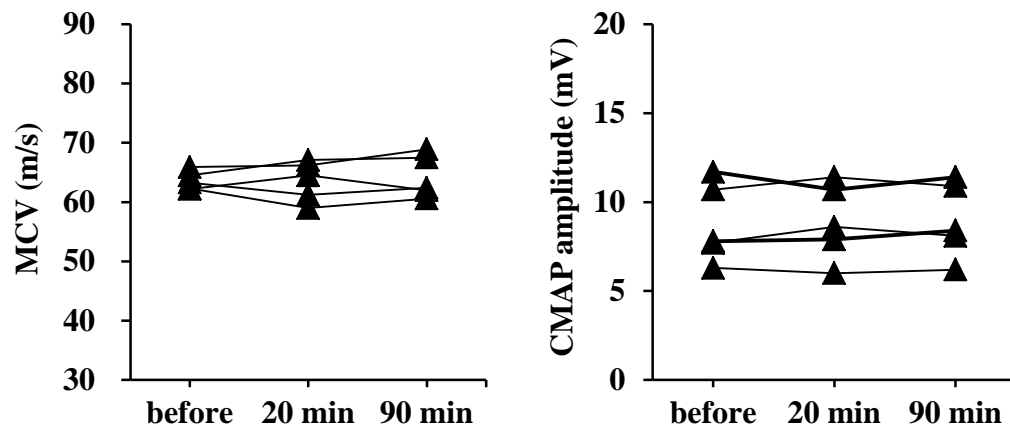


Fig. 4-2: Changes of MCV level and CMAP amplitude before and after administration of 20 mg 3,4-DAP.

Each point is mean \pm S.D. (n = 5).

Table 4-4: Changes in the electrocardiogram (ECG) examination.

No. of volunteer		10 mg		20 mg	
		before	90 min	before	90 min
1	Automatic analysis	normal	abnormal sinus arrhythmia ST elevation	normal sinus arrhythmia	abnormal ST elevation
	Heart rate (bpm)	64	61	75	58
	PR interval (ms)	124	140	132	138
	QRS complex (ms)	110	108	104	108
	QT/QTc interval (ms)	402/412	408/412	396/424	402/399
	P/QRS/T axis (°)	49/69/55	48/66/54	52/68/59	53/68/59
	RV5/SV1 amv (mV)	1.54/0.52	1.57/0.51	1.59/0.61	1.61/0.60
	RV5+SV1 amv (mV)	2.06	2.08	2.20	2.22
2	Automatic analysis	abnormal early repolarization (ST elevation)	normal early repolarization (ST elevation)	borderline ST elevation (suspect early repolarization)	normal early repolarization (ST elevation)
	Heart rate (bpm)	66	61	57	58
	PR interval (ms)	144	150	144	150
	QRS complex (ms)	102	100	100	100
	QT/QTc interval (ms)	394/408	386/389	412/405	418/414
	P/QRS/T axis (°)	60/73/56	52/71/52	58/70/51	60/72/55
	RV5/SV1 amv (mV)	1.73/0.98	1.80/0.80	1.91/0.78	1.99/0.80
	RV5+SV1 amv (mV)	2.72	2.61	2.69	2.79
3	Automatic analysis	normal	normal	normal	borderline ST elevation (suspect early repolarization)
	Heart rate (bpm)	64	60	68	66
	PR interval (ms)	152	164	154	162
	QRS complex (ms)	92	92	94	94
	QT/QTc interval (ms)	371/381	386/388	382/399	372/386
	P/QRS/T axis (°)	42/16/18	53/11/17	57/15/33	57/12/27
	RV5/SV1 amv (mV)	1.09/0.69	1.12/0.74	1.57/0.82	1.76/0.68
	RV5+SV1 amv (mV)	1.78	1.86	2.40	2.44
4	Automatic analysis	normal slight right axis deviation	abnormal first-degree atrioventricular block early repolarization (ST elevation)	normal early repolarization (ST elevation)	abnormal first-degree atrioventricular block early repolarization (ST elevation)
	Heart rate (bpm)	78	73	65	70
	PR interval (ms)	206	218	202	230
	QRS complex (ms)	82	80	84	88
	QT/QTc interval (ms)	360/394	362/388	374/386	382/402
	P/QRS/T axis (°)	73/91/59	72/88/62	69/87/60	73/86/57
	RV5/SV1 amv (mV)	1.85/0.63	1.83/0.67	1.92/0.44	1.95/0.46
	RV5+SV1 amv (mV)	2.48	2.50	2.36	2.41
5	Automatic analysis	abnormal incomplete right bundle branch block increased T wave slight right axis deviation	borderline incomplete right bundle branch block slight right axis deviation	abnormal sinus bradycardia ST elevation (suspect early repolarization) slight right axis deviation	borderline early repolarization (ST elevation) slight right axis deviation
	Heart rate (bpm)	56	51	47	51
	PR interval (ms)	162	174	164	178
	QRS complex (ms)	100	102	104	106
	QT/QTc interval (ms)	454/445	460/438	440/402	426/403
	P/QRS/T axis (°)	33/94/48	42/93/47	67/96/55	66/97/49
	RV5/SV1 amv (mV)	1.88/0.80	1.90/0.77	1.49/0.77	1.55/0.84
	RV5+SV1 amv (mV)	2.68	2.67	2.26	2.40

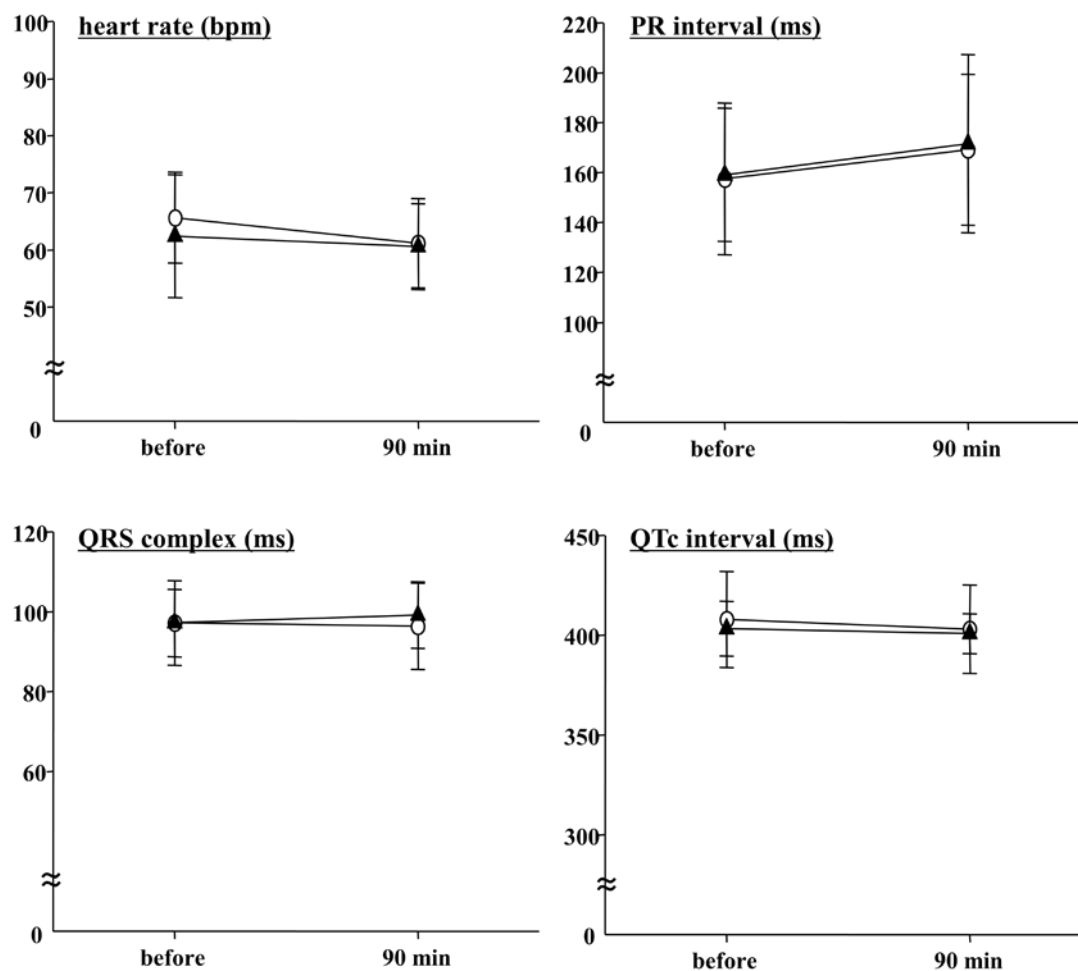


Fig. 4-3: Electrocardiogram (ECG) parameters before and after administration of 3,4-DAP.

Each value is mean \pm S.D. (n = 5).

○: Dose 10 mg, ▲: Dose 20 mg

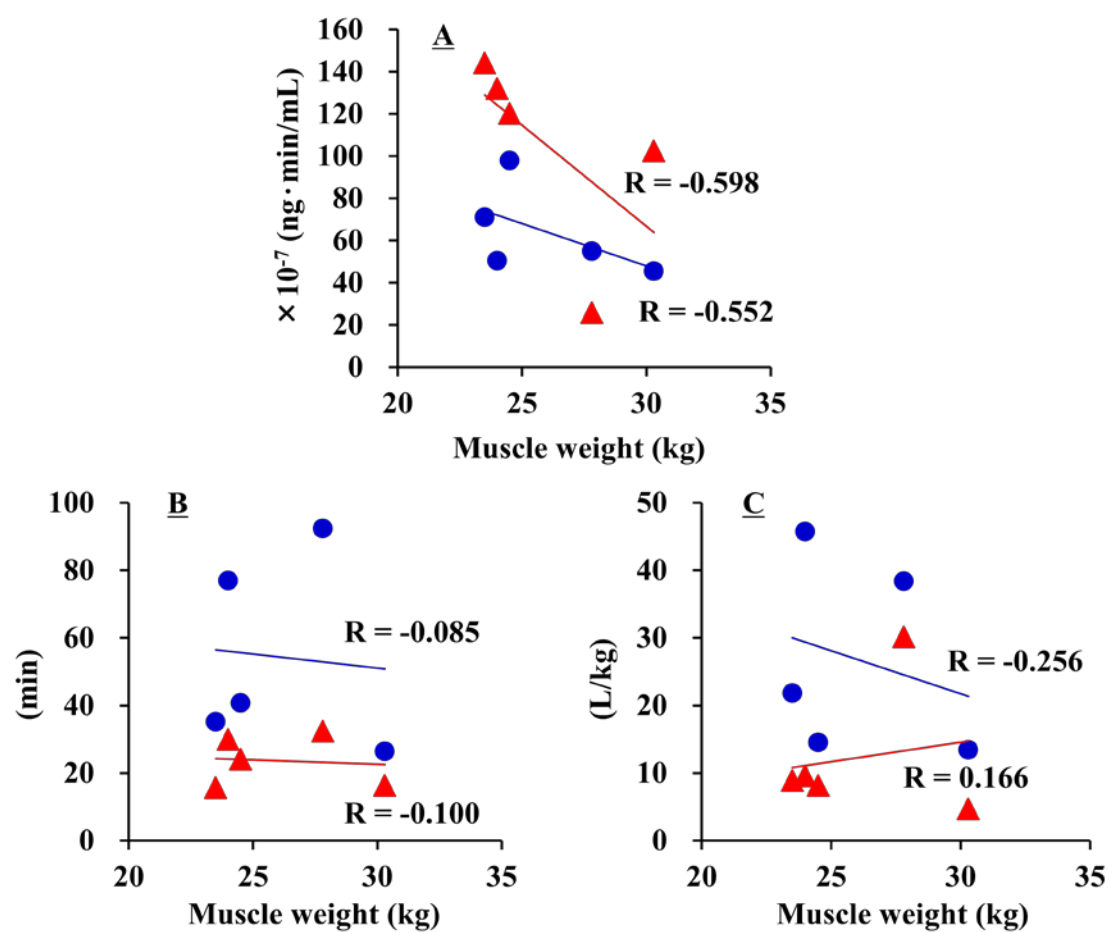


Fig. 4-4: The relationships between muscle weight and AUC/D (A), CL_{tot}/F (B), $T_{1/2}$ (C), Vd/F (D).

○: Dose 10 mg, ▲: Dose 20 mg

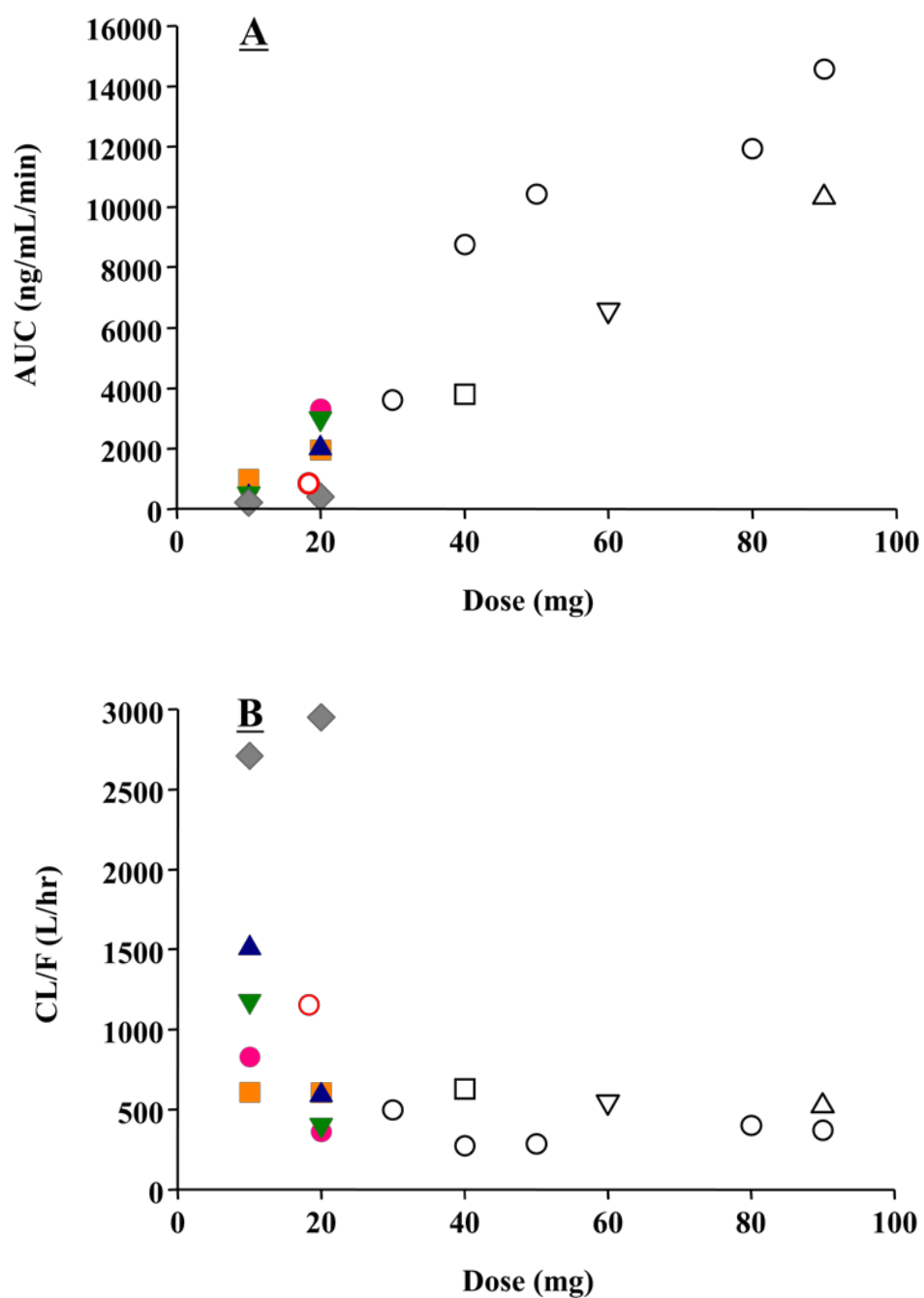


Fig. 4-5: The relationships between dose and AUC (A) or CL/F (B) (Comparison with previous data).

- : Caucasian MS patient 1³⁰⁾
- △: Caucasian MS patient 2³⁰⁾
- : Caucasian MS patient 3³⁰⁾
- ▽: Caucasian MS patient 4³⁰⁾
- : Japanese LEMS patient²⁷⁾
- : Japanese healthy volunteer 1
- : Japanese healthy volunteer 2
- ▲: Japanese healthy volunteer 3
- ▼: Japanese healthy volunteer 4
- ◆: Japanese healthy volunteer 5

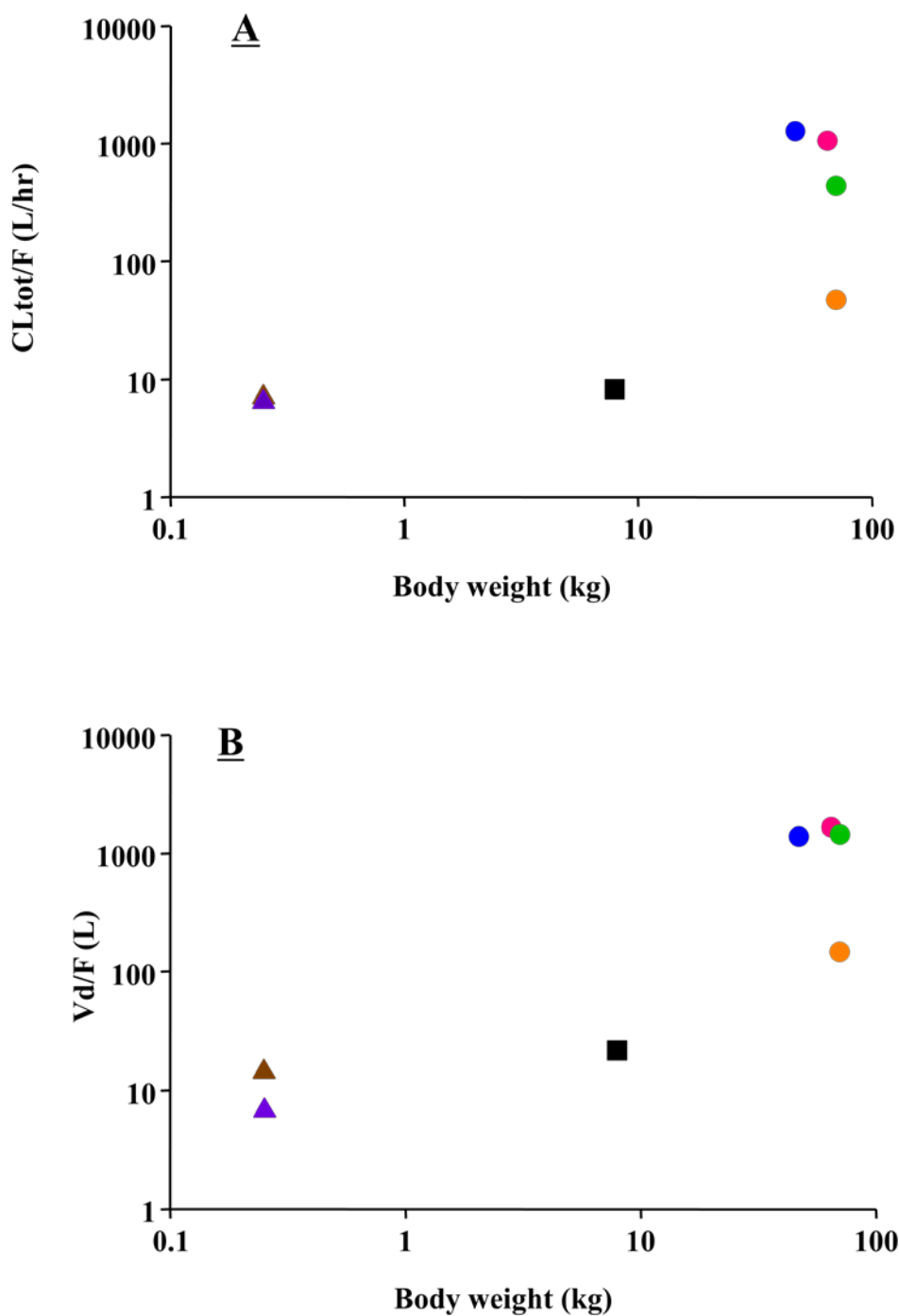


Fig. 4-6: The relationships between CL_{tot}/F (A), V_d/F (B) and the body weights of rats, Beagle dogs, healthy volunteers or patients.

- ▲: SD rat³⁶⁾
- ▲: Wistar rat
- : Beagle dog²⁵⁾
- : Japanese healthy volunteers
- : Japanese LEMS patient²⁷⁾
- : Caucasian MS patient³⁰⁾
- : Caucasian MG patient²⁸⁾

第5章 食事が 3,4-diaminopyridine の体内動態に与える影響の検討

第1節 緒言

第2章において、ラットでの 3,4-DAP の F は 0.251 ± 0.040 と低いことを報告した。また第3章で、日本人 LEMS 患者 1 例を対象とした試験において、空腹時では食後と比較して 3,4-DAP の薬理効果が高くなる可能性があることを報告した。これらより、吸収率を変化させる因子の 1 つである食事が 3,4-DAP の体内動態に影響を与えることが示唆された。

食事が 3,4-DAP の体内動態に影響を与えるかどうかを明らかにするために、第2節の第1項ではラットを用いて、第2項では健常人を対象として 3,4-DAP の単回投与試験を行った。第3項ではさらに食物が 3,4-DAP の消化管吸収に及ぼす影響を *in situ* でラットを用いて検討した。

なお、健常人対象試験は国立病院機構医王病院にて実施した。本実施するにあたり、事前に独立行政法人国立病院機構医王病院倫理委員会における審査を受け、承認を得た後に実施された。また、被験者に対しては、試験前に内容について十分な説明を受け、試験への参加に文書による同意を得た。

第2節 結果

第1項 ラットにおける食事が3,4-DAPの体内動態に及ぼす影響の検討

ラットに3,4-DAPを10 mg/kg経口投与後の血清中3,4-DAP濃度を測定した。その血清中濃度推移の結果をFig. 5-1に、またFig. 5-1のデータを解析して得られた3,4-DAPの薬物動態パラメータをTable 5-1に示す。絶食時には血清中濃度は 37.3 ± 3.7 分で最大となり、その後は減少した。 $T_{1/2}$ は 22.7 ± 4.1 分であり、 AUC_{∞} は 21127 ± 3372 ng·min/mLとなった。エレンタール投与30分後に3,4-DAPを投与した群では、血清中濃度は 52.2 ± 2.0 分で最大となり、その後は減少した。 $T_{1/2}$ は 23.1 ± 5.1 分であり、 AUC は 10473 ± 636 ng·min/mLとなった。Fは第2章において報告したラットに3,4-DAP 2 mg/kg 静脈内投与した際の AUC_{∞} 17171 ng·min/mLを用いて算出した。絶食時の投与ではFは 0.246 ± 0.039 、食後投与では 0.122 ± 0.007 となった。食後投与では T_{max} が有意に遅延し、また AUC_t 、 AUC_{∞} およびFは有意に低下した。

第2項 健常人における食事が3,4-DAPの体内動態に及ぼす影響の検討

第4章で対象とした健常日本人男性5名において、3,4-DAPを10 mg 経口投与後の血清中3,4-DAP濃度を測定した。血清中濃度推移の結果をFig. 5-2に、またFig. 5-2のデータを解析して得られた3,4-DAPの薬物動態パラメータをTable 5-2に示す。空腹時投与では血清中濃度は 20 ± 6 分で最大となり、その後は減少した。 $T_{1/2}$ は 43.6 ± 31.2 分であり、 AUC_{∞} は 764 ± 313 ng·min/mLであった。

食後投与では、血清中濃度は 37 ± 22 分で最大となり、その後は減少した。 $T_{1/2}$ は 54.4 ± 28.7 分であり、 AUC_{∞} は $639 \pm 213 \text{ ng} \cdot \text{min/mL}$ であった。したがって AUC は 16 % 低下していることがわかった。

第3項 ラットを用いた *in situ* での食事の影響の検討

Fig. 5-3-1, 5-3-2 に 3,4-DAP 2 mg/kg 投与群および 0.2 mg/kg 投与群での 3,4-DAP の吸収率の推移を示す。2 mg/kg 投与群において、60 分間での吸収率は上部で 33.8 %、中部で 36.1 %、下部で 52.9 % となった。0.2 mg/kg 投与群において、60 分間での吸収率は上部で 47.3 %、中部で 47.8 %、下部で 57.9 % となった。高用量投与した際に上部での吸収率が有意に低下した。

Fig. 5-4-1, 5-4-2 に 3,4-DAP 2 mg/kg 投与した際の食物成分共存下での、3,4-DAP の吸収率の推移を示した。テルミール投与群において、60 分間での吸収率は上部で 26.5 %、中部で 32.5 %、下部で 45.4 % となり、上部での吸収率がコントロール群と比較して有意に低下した。エレンタール投与群において、60 分間での吸収率は上部で 26.0 %、中部で 31.5 %、下部で 42.5 % となり、上部、中部、下部での吸収率がコントロール群と比較して有意に低下した。

第3節 考察

第2節第1項では、ラットを用いて 3,4-DAPの吸収に及ぼす食事の影響について検討を行った。AUCおよびFはそれぞれ絶食時の約 50 %であり、有意な低下が見られた。T_{max}の有意な延長や、C_{max}の低下傾向が見られた。食事によるAUCの変化の原因としては胃内容物排出速度の変化、または 3,4-DAPの吸収率自体の低下等が原因として考えられた。

ラットを用いて、食事の影響を検討した結果、食事によってAUCの低下が見られたため、第2項では、健常日本人を用いて 3,4-DAPの吸収に及ぼす食事の影響について検討を行った。ラットでの検討と同様にT_{max}の延長やC_{max}の低下傾向が見られ、AUCは低下傾向を示した。したがって 3,4-DAPを経口で服薬する際には、食事の影響を考慮する必要があることが明らかとなった。

第3項では、3,4-DAPの消化管吸収の特性を明らかにするために *in situ loop* 法にて、まず投与量による 3,4-DAP の消化管吸収の違いについて検討した。2 mg/kg 投与群では、0.2 mg/kg 投与群と比較して、上部の吸収が有意に抑制されることがわかった。Fig. 5-3 より上部、中部、下部それぞれにおいて 0.2 mg/kg 投与群では経過時間に比例して吸収率が増加したのに対し、2 mg/kg 投与群では吸収が頭打ちになる様子が見られた。このことから、3,4-DAP の腸管からの吸収は受動拡散ではなく何らかの能動輸送が関与していることが示唆された。

次に、食物の栄養成分が 3,4-DAP の腸管からの吸収に及ぼす影響を検討した。本実験で用いたテルミール 2.0 α は高カロリーの液状栄養食である半消化態栄養剤であり、エレンタールはアミノ酸が主成分である成分栄養剤である。テルミール投与群ではコントロール群と比較して上部で 7 %程度の吸収率の低下が見られた。また、エレンタール投与群では、コントロール群と比較して上部、中部、下部にて 5~10 %程度の吸収率の低下が見られた。これらのことから、食物

摂取により 3,4-DAP の腸管からの吸収率が抑制されることがわかった。また、テルミール投与群でもエレンタール投与群でも同様な傾向が見られたため腸管からの吸収の抑制には、食事の成分による差は少ないことが示唆された。

第2節第1項のラットでの実験では食物摂取後に 3,4-DAP を投与したことによってFやAUCの約 50 %の有意な低下が見られた。さらに第2項の健常人での実験では食事によりAUCは 16 %の低下傾向が見られた。また、第3項での検討により、*in situ*において食物により 3,4-DAP の腸管からの吸収が抑制されることがわかった。以上より、食事が 3,4-DAP の吸収を低下させる因子であることがわかった。ただ、第1項でのラットの実験により、エレンタール投与群ではAUCやFが約 50 %低下したのに対し、今回の*in situ*での実験ではエレンタール投与群では腸管からの吸収は 5～10 %程度の抑制しか見られず、食事による腸管からの吸収抑制だけでは説明できない。原因として、3,4-DAP が腸管のK⁺チャンネルに作用すること、*in vivo*では副作用として下痢の報告⁴¹⁾があることから、蠕動運動が吸収率低下に関係している可能性が考えられた。

一方、Firdapse[®] Product information (Annex I - Summary of product characteristics)²⁹⁾においては、本研究と同様に食事によりT_{max}の延長傾向が認められたが、3,4-DAP 20mg服用のAUCは空腹時では 7020 ± 4596 ng/mL/min、食後（高脂肪食）では 6540 ± 4602 ng/mL/minと大きな差は認めなかった。原因として、本研究で使用した 3,4-DAP と異なりFirdapse[®]はリン酸塩製剤であり、Fが 0.93～1 と大きく、吸収率に対する食事の影響が小さいことが考えられる。

本章第2節第2項で得られた健常人に空腹時に 3,4-DAP を投与した場合の体内動態パラメータと、第3章における LEMS 患者1例（投与量 18.3 mg 空腹時服用）について筋肉量と体内動態パラメータとの関係について Fig. 5-5 に示した。本 LEMS 患者は女性であることから、健常人男性よりも筋肉量は低い傾向にあった。AUC/D は LEMS 患者では健常人と比較して低値となったが、これは筋

肉量による違いか疾患に基づく違いかは不明である。本 LEMS 患者は 3,4-DAP を 2000 年より服用している。3,4-DAP の体内動態については患者で個体差があると報告されており、また長期投与に伴い、薬効が減弱するとの報告もあり、患者では体内動態が変動している可能性がある。組織への蓄積性については不明である。AUC/D が筋肉量が多いほど低値を示す傾向は第 4 章での検討と一致した。患者を対象として更なる検討が必要である。

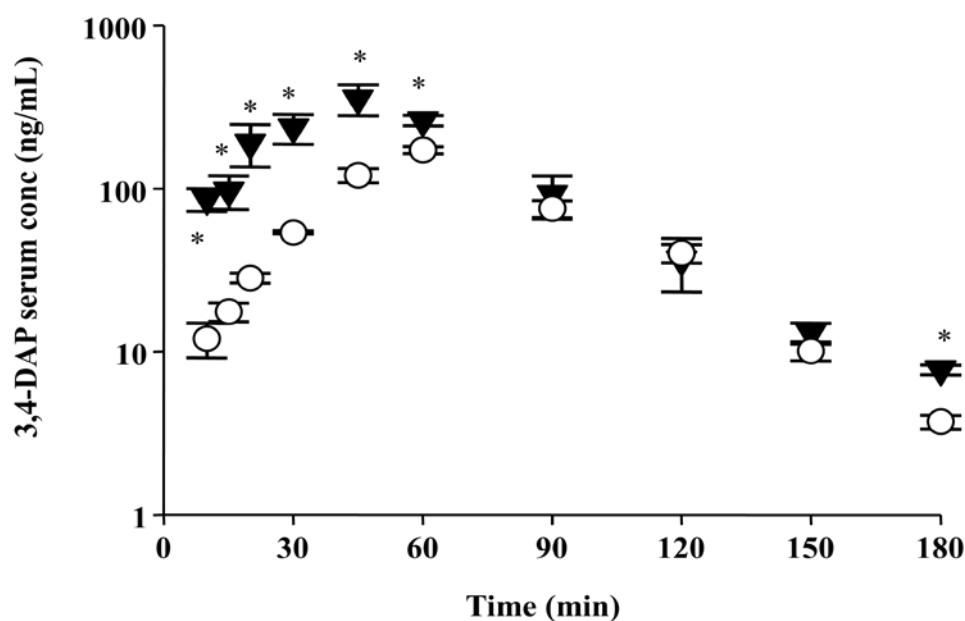


Fig. 5-1: Time courses of 3,4-DAP serum concentrations after 10 mg/kg oral administration to rats after a fasting period or after food intake.

Each point is mean \pm S.D. (n = 3 - 4, *P < 0.05).

▼: fasting ○: after food intake

Table 5-1: Pharmacokinetics parameters of 3,4-DAP after 10 mg/kg oral administration to rats after a fasting period or after food intake.

	fasting	after food intake	
T_{max} (min)	37.3 ± 3.7	52.2 ± 2.0	*
$T_{1/2}$ (min)	22.5 ± 4.1	23.1 ± 5.1	
C_{max} (ng/mL)	236.5 ± 59.5	165.2 ± 19.9	
AUC_t (ng·min/mL)	20846 ± 3380	10131 ± 727	*
AUC_{∞} (ng·min/mL)	21127 ± 3372	10473 ± 636	*
CL_{tot}/F (mL/min/kg)	480 ± 86	957 ± 59	*
Vd_{ss}/F (L/kg)	27.6 ± 6.4	70.7 ± 7.3	*
F	0.246 ± 0.039	0.122 ± 0.007	*

Each point is mean \pm S.D. (n = 3 - 4, *P < 0.05).

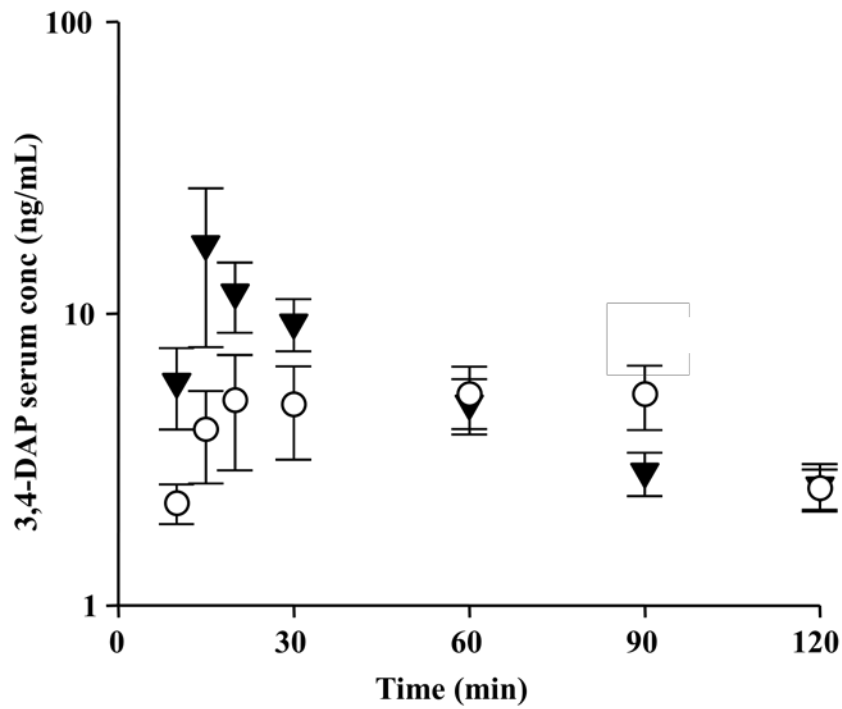


Fig. 5-2: Time courses of 3,4-DAP serum concentrations after oral administration of 10 mg to healthy volunteers after a fasting period or after food intake.
Each point is mean \pm S.D. (n = 5).
▼: fasting ○: after food intake

Table 5-2: Pharmacokinetics parameters of 3,4-DAP after oral administration of 10 mg to healthy volunteers after a fasting period or following food intake.

	fasting	after food intake
T_{\max} (min)	20 ± 6	37 ± 22
$T_{1/2}$ (min)	43.6 ± 31.2	54.4 ± 28.7
C_{\max} (ng/mL)	13.8 ± 6.75	8.09 ± 4.47
AUC_t (ng·min/mL)	615 ± 310	432 ± 250
AUC_{∞} (ng·min/mL)	764 ± 313	639 ± 213
CL_{tot}/F (mL/min/kg)	245 ± 130	262 ± 56
Vd_{ss}/F (L/kg)	16 ± 9	27 ± 15

Each point is mean \pm S.D. (n = 5).

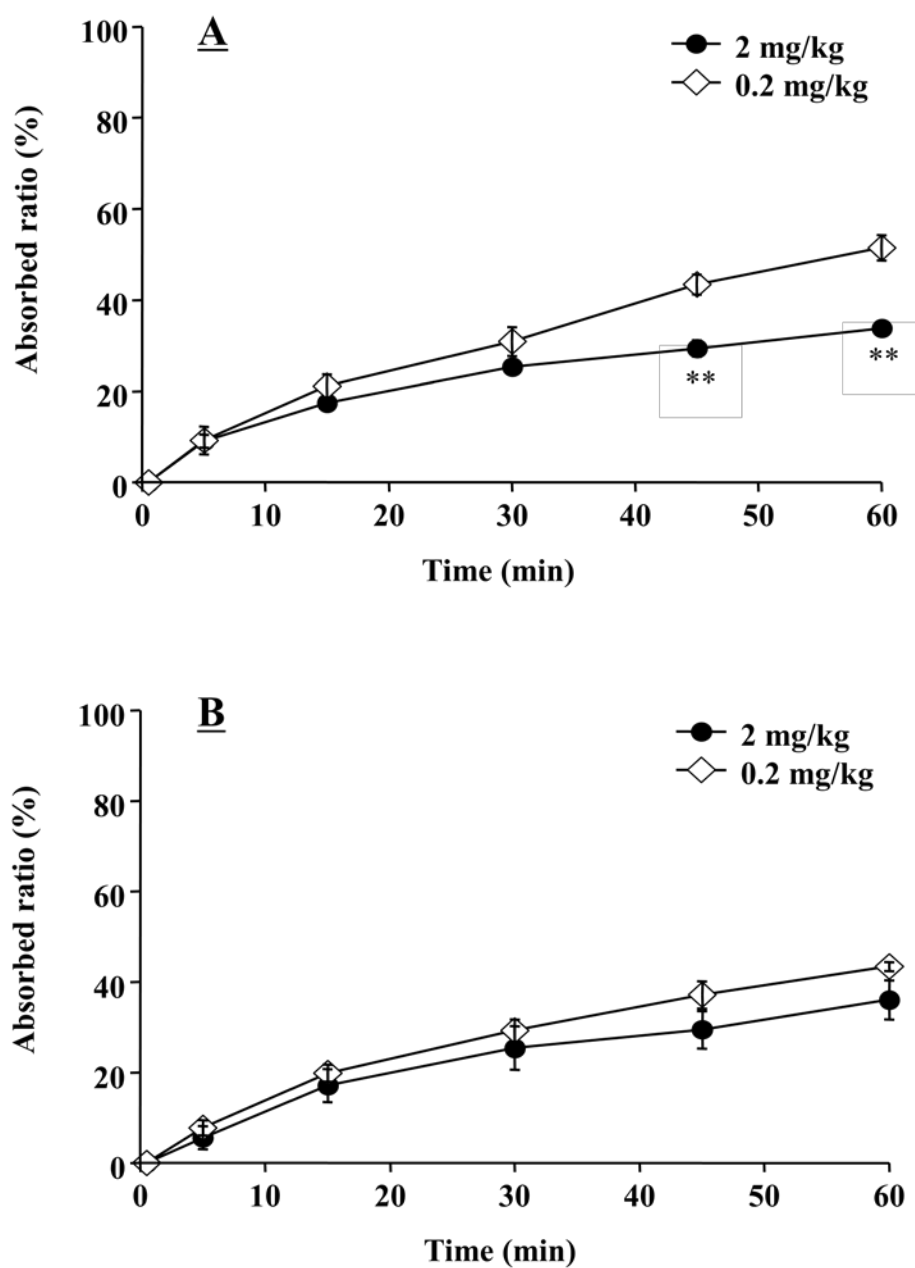


Fig.5-3-1: Absorbed ratio of 3,4-DAP in the upper loop (A) and the middle loop (B) after administration of 3,4-DAP in the *in situ* loop study.

Each point is mean \pm S.D. (n = 4 - 5, *P < 0.05, **P < 0.01).

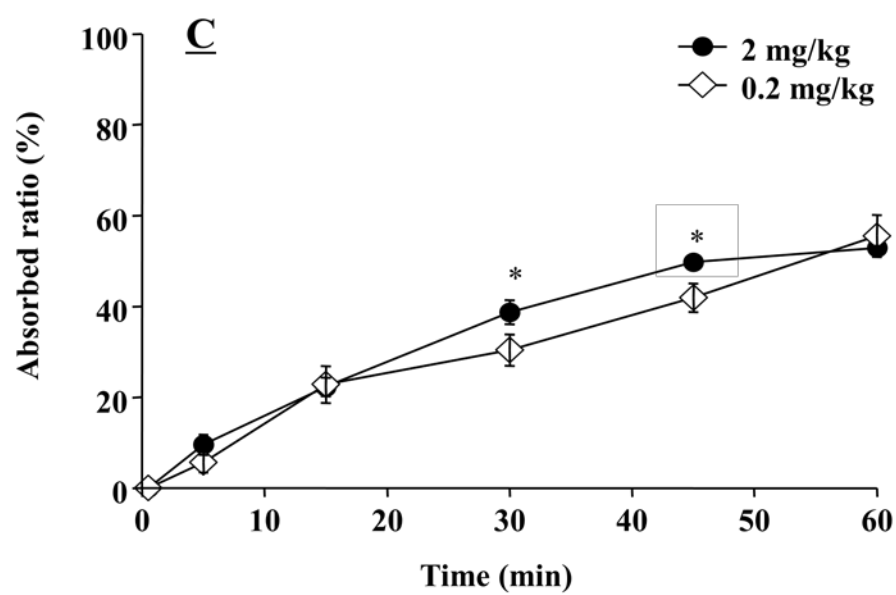


Fig.5-3-2: Absorbed ratio of 3,4-DAP in the lower loop (C) after administration of 3,4-DAP in the *in situ* loop study.

Each point is mean \pm S.D. (n = 3 - 4, *P < 0.05, **P < 0.01).

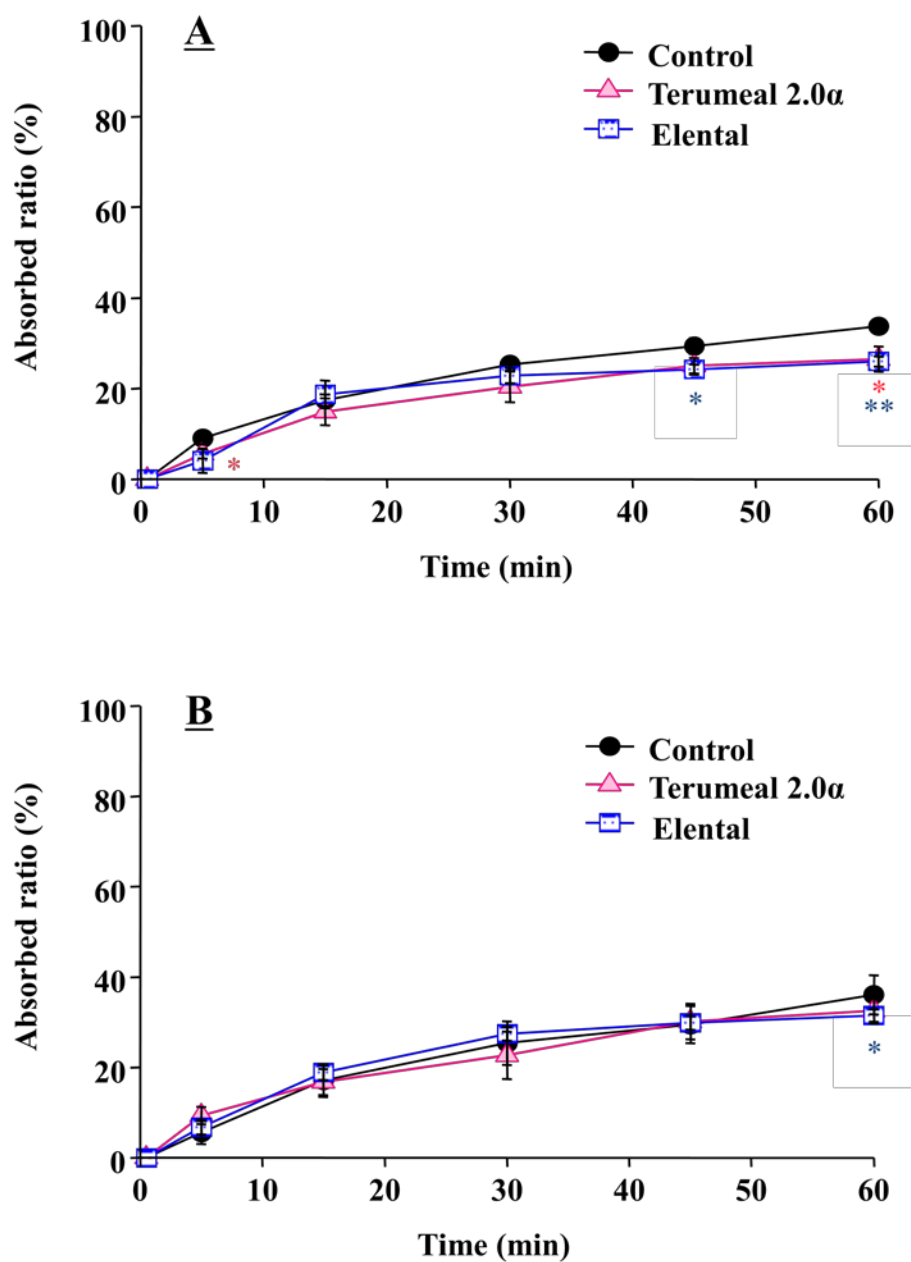


Fig.5-4-1: Absorbed ratio of 3,4-DAP in the upper loop (A) and the middle loop (B) after administration of 3,4-DAP (2 mg/kg) with meal in the *in situ* loop study.

Each point is mean \pm S.D. (n = 4, *P < 0.05, **P < 0.01).

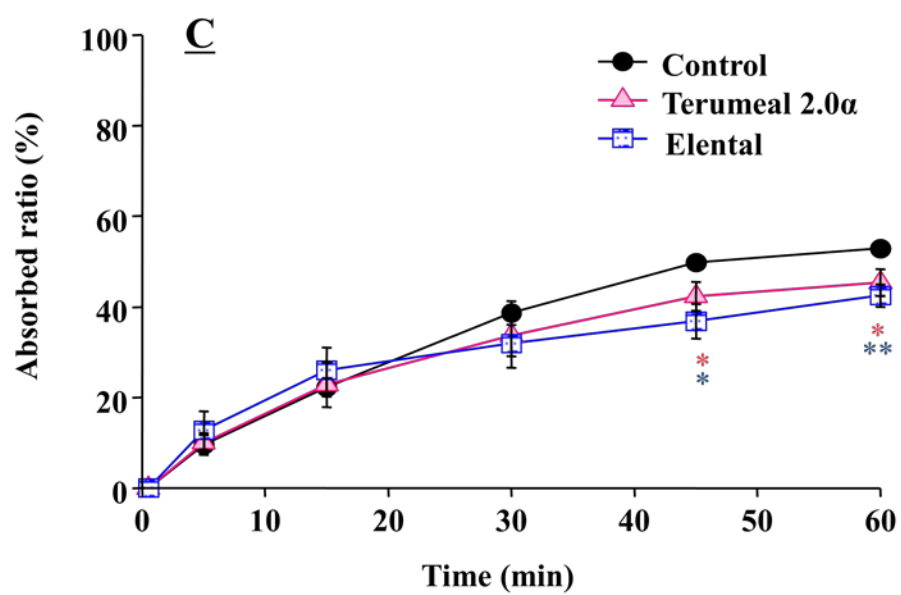


Fig.5-4-2: Absorbed ratio of 3,4-DAP in the lower loop (C) after administration of 3,4-DAP (2 mg/kg) with meal in the *in situ* loop study.

Each point is mean \pm S.D. (n = 4 - 5, *P < 0.05, **P < 0.01).

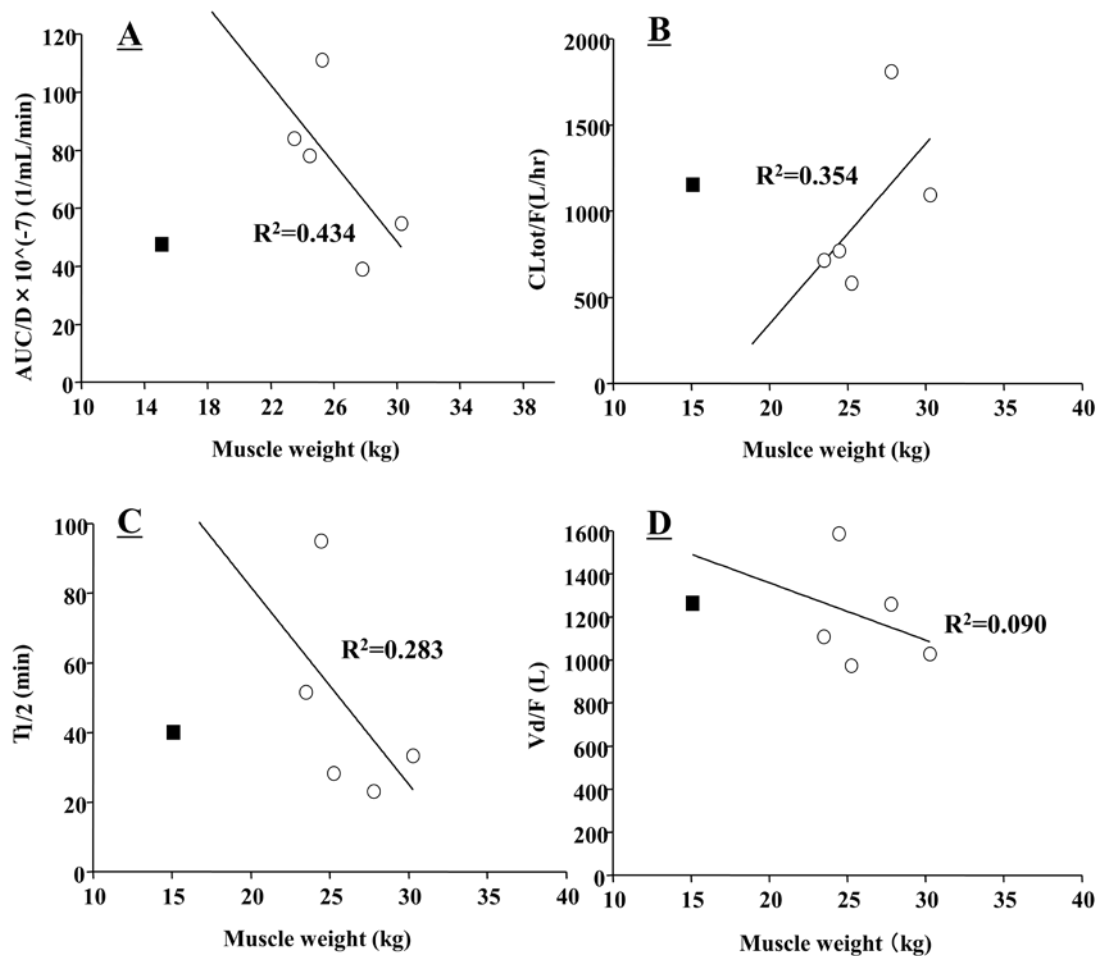


Fig. 5-5: The relationship between muscle weight and AUC/D (A), CL_{tot}/F (B), $T_{1/2}$ (C), V_d/F (D) in the fasting state.

○: Japanese healthy volunteers ■: Japanese LEMS patient²⁷⁾

第6章 結論

本研究では、3,4-DAP の患者への安全で有効な使用方法の確立を目的とし、3,4-DAP のラットとヒトにおける体内動態について検討した。そして、以下のよう結果を得た。

ラットにおける 3,4-DAP の薬物動態パラメータについては、血清中半減期は単回静注時では 15.9 ± 3.1 分と短く、 V_d が 2.85 ± 0.73 L/kg と大きく、全身クリアランスは 120 ± 23 mL/min/kg と大きかった。また、経口投与時の $T_{1/2}$ は 22.5 ± 4.1 分であった。ラットでの F は 0.246 ± 0.039 となり、 F が体内動態変動因子となる可能性が示唆された。

日本人の LEMS 患者について一症例ではあるが、血清中濃度測定と体内動態パラメータを算出した。その患者の 3,4-DAP の血清中半減期は 40.0 分であり、ラット経口投与時とほぼ同じであった。また、3,4-DAP の血清中濃度が低下しているにもかかわらず、効果は持続していた。このことから血清中濃度と効果との間にずれが生じており、血中濃度の減衰だけから投与間隔を決定することは難しいことが推測された。

3,4-DAP の健常人での体内動態は、 V_d/F は 12 L/kg から 27 L/kg と大きく、また $T_{1/2}$ は 23.6 分から 54.4 分と短く、血清中からの消失は早い組織への移行性は良い特徴を示す薬物である。この事はラットや LEMS 患者における体内動態と同様な傾向であった。健常人では、投与量を 2 倍に上げることで C_{max} や AUC は 3 ～ 4 倍上昇したことから、3,4-DAP の薬物動態が非線形性を示す可能性が示唆された。また、筋肉量が多いほど、 AUC は低くなる傾向が見られ、筋肉量の違いが個体間変動因子となりうることを示唆された。3,4-DAP の副作用として臨床上問題ない程度ではあるが心電図の波形に異常を示すため、3,4-DAP 服用中は定期

的な心電図検査が必要である。食事は 3,4-DAP の吸収率を低下させる因子の 1 つである。

以上より、3,4-DAP が非線形性の薬物動態を示す薬剤であり、体内動態変動因子として、筋肉量、食事の影響があげられることが分かった。一方、血清中濃度や体内動態パラメータと薬効との関係については検討できなかった。

本研究により、3,4-DAP のラットと健常日本人における体内動態に関する情報が示された。また、日本人のある LEMS 患者において初めて血清中濃度を測定し、報告した。3,4-DAP の体内動態の変動要因と薬効を解明する上での臨床試験遂行のための基礎的知見を得ることができた。今後さらなる症例の蓄積が期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かい御指導と御助言を賜いました、金沢大学医薬保健研究域薬学系 自然科学研究科 松下良 教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、御指導と御助言を頂くとともに、本研究にご協力頂きました独立行政法人国立病院機構医王病院 駒井清暢 副院長に深謝致します。

本研究の実験に際し、様々な実験機器や場所を貸していただきました金沢大学保健研究域薬学系国際保健薬学研究室の皆様にご心から感謝を表します。

終始御協力頂いた 近藤祐也 修士、小林 恵里奈 学士、上田真理 学士をはじめ、臨床薬物情報学研究室、国際保健薬学研究室、附属病院薬剤部の諸氏、諸賢に深く感謝致します。

そして本研究を遂行するにあたり、犠牲となった実験動物に感謝するとともに冥福を御祈りいたします。

最後になりましたが、御支援を頂きました家族に感謝いたします。

実験の部

1. 試薬および機器

以下特に断らない限りは，試薬は特級をそのまま用いた。

1-1. 投与薬物及び試薬

1-1-1. 投与した薬物

3,4-ジアミノピリジン

和光純薬工業(株)

D-(－)-マンニトール

ナカライテスク(株)

1-1-2. 麻酔に使用した薬物

ジエチルエーテル

ナカライテスク(株)

ペントバルビタールナトリウム

ナカライテスク(株)

1-1-3. *in situ* 実験で使用した栄養剤

テルミール 2.0 α

テルモ(株)

エレンタール

味の素製薬(株)

1-1-4. その他

塩化ナトリウム

ナカライテスク(株)

ヘパリンナトリウム

ナカライテスク(株)

1-2. 薬物の定量に使用した試薬

1-2-1. 3,4-DAP の前処理に使用した試薬

メタノール	ナカライテスク(株)
1- ヘプタンスルホン酸ナトリウム	和光純薬工業(株)
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	和光純薬工業(株)
水酸化ナトリウム	和光純薬工業(株)
塩酸	ナカライテスク(株)

1-2-2. 3,4-DAP 測定での HPLC の移動相に使用した試薬

1- ヘプタンスルホン酸ナトリウム	和光純薬工業(株)
リン酸水素二ナトリウム十二水和物	ナカライテスク(株)
水酸化ナトリウム	和光純薬工業(株)
塩酸	ナカライテスク(株)
アセトニトリル	ナカライテスク(株)

1-3. 機器

1-3-1. 血清の分離に使用した機器

インバータマイクロ冷却遠心機 1720	久保田製作所
himac CR5DL	HITACHI
himac CT6D	HITACHI

1-3-2. 3,4-DAP の分離に使用した機器

OASIS HLB (30 mg)

Waters

VAC-ELUT

Analytichem

1-3-3. HPLC による 3,4-DAP の定量に使用した機器

カラム : 5C18-MS- II Waters (250 mm×4.6 mm)

ナカライテスク(株)

クロマトパック : C-R7A plus

島津製作所(株)

オートインジェクター : SIL-10AXL

島津製作所(株)

カラムオーブン : CTO-10A

島津製作所(株)

UV 検出器 : SPD-10A

島津製作所(株)

ポンプ : LC-10A

島津製作所(株)

システムコントローラー : SCL-10A

島津製作所(株)

1-3-4. ラットにおける実験で使用した機器

持続注入ポンプ : SYRINGE INFUSION PUMP 22

Polyethylene tube SP 45

夏目製作所

医療用チューブ SH No.00

カネカメディックス(株)

1-3-5. ヒトにおける実験で使用した機器

デジタル握力計 : GRIP-D

武井機器工業(株)

心電計 : ECG-1400

日本光電工業(株)

筋電図・誘発電位検査装置 : MEB-2208

日本光電工業(株)

2. 実験方法

2-1. 3,4-DAP の血清中濃度測定

2-1-1. 検量線作成用サンプルの調製（ラット血清）

3,4-DAP 10 mg と水 10 mL を混合し 1 mg/mL の原液を作成した。その後 10 倍希釈を希釈液として蒸留水を用いて 2 回繰り返す、 $10 \mu\text{g/mL}$ の溶液を調製し、次にその溶液をラット血清を希釈液として用いて 10 倍希釈することで、血清が 90% の $1 \mu\text{g/mL}$ 溶液を調製した。さらに $1 \mu\text{g/mL}$ 溶液をラット血清を用いて希釈し、400 ng/mL 溶液を調製した後、400 ng/mL 溶液をラット血清を用いて 2 倍ずつ段階希釈することにより、200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 ng/mL 溶液を調製した。

2-1-2. サンプルの前処理（ラット血清）

前処理は固相抽出により行った。固相抽出はアスピレーターと VAC ELUT を用いて減圧下において行った。まず、固相抽出カラム（Oasis HLB (30 mg), Extration Cartridges, Waters）にメタノール 1 mL を通し、その後、水を 1 mL 通しプレコンディショニングを行った。次に固相抽出カラムにサンプルを $150 \mu\text{L}$ 通し、続けて水を 1 mL 通し洗浄した。

その後、抽出液として移動相 $250 \mu\text{L}$ 通し、この液を回収した。この回収液を HPLC に $150 \mu\text{L}$ インジェクションした。

2-1-3. HPLC 条件（ラット血清）

カラム：5C₁₈-MS - II Waters (250 mm × 4.6 mm i.d.)

移動層：リン酸水素二ナトリウム (50 mM), 1-ヘプタンスルホン酸 (10 mM) :

アセトニトリル = 97 : 3 (v/v) (pH 4.0)

流速 : 1.0 mL/min

測定波長 : 229 nm

測定時間 : 30 min

カラム温度 : 40 °C

2-1-4. 検量線作成用サンプルの調製 (ヒト血清)

3,4-DAP 10 mg と水 10 mL を混合し 1 mg/mL の原液を作成した。その後 10 倍希釈を希釈液として蒸留水を用いて 2 回繰り返す, 10 μ g/mL の溶液を調製し, 次にその溶液をヒト血清 (新鮮凍結血清-LR「日赤」) を希釈液として用いて 10 倍希釈することで, ヒト血清が 90% の 1 μ g/mL 溶液を調製した。さらに 1 μ g/mL 溶液をヒト血清を用いて希釈し, 400 ng/mL 溶液を調製した後, 400 ng/mL 溶液をヒト血清を用いて 2 倍ずつ段階希釈することにより, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57 ng/mL 溶液を調製した。

2-1-5. サンプルの前処理 (ヒト血清)

前処理は固相抽出により行った。固相抽出はアスピレーターと VAC ELUT を用いて減圧下において行った。まず, 固相抽出カラム (Oasis HLB (30 mg), Extration Cartridges, Waters) にメタノール 1 mL を通し, その後, 水を 1 mL 通しプレコンディショニングを行った。次に固相抽出カラムにサンプルを 250 μ L 通し, 続けて水を 1 mL 通し洗浄した。

その後, 抽出液として移動相 250 μ L 通し, この液を回収した。この回収液を HPLC に 150 μ L インジェクションした。

2-1-6. HPLC 条件（ヒト血清）

カラム：5C₁₈-MS - II Waters（250 mm × 4.6 mm i.d.）

移動層：リン酸水素二ナトリウム（50 mM），1-ヘプタンスルホン酸（10 mM）：

アセトニトリル = 97：3（v/v）（pH 4.0）

流速：1.0 mL/min

測定波長：229 nm

測定時間：30 min

カラム温度：40℃

この抽出条件での 3,4-DAP 1.57～400 ng/mL におけるピーク高さの平均値と CV 値（%）を以下に示す。

3,4-DAP concn (ng/mL)	peak height mean ± SD	CV(%)
1.57	83.4 ± 7.8	9.44
3.13	173.7 ± 16.7	9.59
6.25	393.5 ± 28.5	7.24
25	1774.8 ± 93.5	5.27
100	7204.4 ± 195.5	2.71
400	28620.1 ± 1355.6	4.74

1.57～400 ng/mL の範囲での CV 値は 10 %以下であり，この抽出方法で血清中濃度を測定した場合の検出限界は 1.57 ng/mL とした。

2-2. ラットにおける実験

2-2-1. 3,4-DAP 静脈内投与実験

実験には Wister 系雄性ラットを用いた。ラットにジエチルエーテルで麻酔をかけ、頸静脈を露出した。3,4-DAP 2 mg/kg を頸静脈より注射し、投与後、2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 分後に投与した頸静脈とは逆側の頸静脈より血液を約 0.3 mL 採取した。また、90 分後の採血では採取可能な限りの血液を採取した。注射筒はあらかじめヘパリン処理を行っておいた。血液サンプルは 4℃, 12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を取り、分析まで -30℃ で保存した。

2-2-2. 3,4-DAP 単回経口投与実験

実験には Wister 系雄性ラットを用いた。薬物投与の前日の夕方には、採血のために外科的処置を行った。生理食塩水に溶解させたペントバルビタールナトリウム塩を 30 mg/kg 腹腔内投与して麻酔をかけ、必要に応じてジエチルエーテルも麻酔に用いた。右頸静脈にヘパリンロック 10 IU/mL を満たしたカテーテルを挿入、固定した後に約 12 時間絶食させた。

翌日、3,4-DAP 10 mg/kg をラットに経口投与し、投与後、10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 分後に注射筒を用いてカテーテルより血液を採取した。また、180 分後以降には採取可能な限りの血液を採取した。注射筒はあらかじめヘパリン処理を行っておいた。血液サンプルは 4℃, 12000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を取り、分析まで -30℃ で保存した。

なお、カテーテルは Polyethylene tube SP 45 と医療用チューブ SH No.00 を連結して作成した。

2-2-3. 食事の影響を検討する実験

実験には Wister 系雄性ラットを用いた。薬物投与の前日の夕方には、採血のために外科的処置を行った。生理食塩水に溶解させたペントバルビタールナトリウム塩を 30 mg/kg 腹腔内投与して麻酔をかけ、必要に応じてジエチルエーテルも麻酔に用いた。右頸静脈にヘパリンロック 10 IU/mL を満たしたカテーテルを挿入、固定した後に約 12 時間絶食させた。

絶食群では、翌日 3,4-DAP 10 mg/kg をラットに経口投与し、投与後、10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 分後に注射筒を用いてカテーテルより血液を採取した。また、180 分後以降には採取可能な限りの血液を採取した。注射筒はあらかじめヘパリン処理を行っておいた。血液サンプルは 4°C, 12000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を取り、分析まで -30°C で保存した。

食事摂取群では、エレンタールを生理食塩水に溶解して 1 kcal/mL としたものを 1 mL 経口投与した後、30 分後に 3,4-DAP 10 mg/kg を経口投与し、絶食群と同様に経時的に採血を行った。

なお、カテーテルは Polyethylene tube SP 45 と医療用チューブ SH No.00 を連結して作成した。

2-3. LEMS 患者における実験

2-3-1. 3,4-DAP 血清中濃度測定

独立行政法人国立病院機構医王病院の倫理委員会の承認を得た後、文書同意を得た日本人 LEMS 患者 1 名を対象として行った。3,4-DAP 経口投与前 60, 30 分と経口投与後 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 分後に採血を行い HPLC により測定した。血液サンプルは室温、1500 rpm で 10～15 分間遠心分離して血清を取り、分析ま

で-80℃で保存した。

2-3-2. 握力測定

3,4-DAP 投与前 80 分および投与後 30,110 分後に握力測定を行った。

2-3-3. 神経伝導検査

3,4-DAP投与前および投与後60分後に神経伝導検査を行った。運動神経伝導検査を行い、左前腕の正中神経について、運動複合筋活動電位（CMAP）振幅を測定した。

2-4. 健常人における実験

2-4-1. 第4章の実験

2-4-1-1. 3,4-DAP 血清中濃度測定

独立行政法人国立病院機構医王病院の倫理委員会の承認を得た後、文書同意を得た日本人健常人男性 5 名を対象として行った。3,4-DAP は固形の総合栄養食品を摂取後 30 分以内に服用することとした。3,4-DAP 経口投与後 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 分後に採血を行い HPLC により測定した。血液サンプルは室温, 1500 rpm で 10～15 分間遠心分離して血清を取り、分析まで-80℃で保存した。

2-4-1-2. 心電図検査

3,4-DAP投与前および投与後90分後に12誘導心電図検査を行った。

2-4-1-3. 神経伝導検査

3,4-DAP投与前および投与後60分後に神経伝導検査を行った。運動神経伝導検査を行い、左前腕の正中神経について、前腕区間での伝導速度（MCV）、運動複合筋活動電位（CMAP）振幅を測定した。

2-3-1-4. 筋肉量の推定

筋肉量は被験者の体重および体脂肪率の実測値より下式を用いて計算により求めた。

$$\text{体重} \times \text{体脂肪率} = \text{体脂肪量}$$

$$\text{筋肉量} = (\text{体重} - \text{体脂肪量}) / 2$$

2-4-2. 第5章の実験

独立行政法人国立病院機構医王病院の倫理委員会の承認を得た後、文書同意を得た日本人健常人男性 5 名を対象としてクロスオーバー試験を行った。空腹時および食後に 3,4-DAP を 10 mg 経口投与した後、10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 分後に採血を行い HPLC により測定した。血液サンプルは室温、1500 rpm で 10～15 分間遠心分離して血清を取り、分析まで-80℃で保存した。

空腹時服用の際は最終食事摂取後 6 時間経過した状態で、食後服用の際は固形の総合栄養食品を摂取後 30 分以内に 3,4-DAP を服用することとした。

2-5. *in situ* における実験

2-5-1. 薬液の調製

isotonic-2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) buffer (5 mM KCl, 100 mM

NaCl, 10 mM MES, 85 mM mannitol, 0.01 % polyethyleneglycol; pH 6.4) を調製した。

食事成分としてテルミール 2.0 α およびエレンタールを使用した。テルミール 2.0 α およびエレンタールに MES buffer を加えて各溶液 1 mL に対してそれぞれ 1.8 kcal, 1 kcal となるように調製した。Control 群には MES buffer を用いた。各溶液 1 mL に 3,4-DAP 2 mg/kg を溶解し、37°C に加温した。

2-5-2. *in situ* loop 法

Jinらの方法およびIgarashiらの方法⁴²⁾に修正を加えて行った。具体的にはラットはペントバルビタール (30 mg/kg) 腹腔内投与にて麻酔をかけた。正中線に沿って開腹し、腸管を露出させた。トライツ靱帯から 10 cm を測り、その両端にはさみで切れ目を入れ、腸管内を 37°C に加温したMES bufferで 3 回洗浄した。腸管内に空気を注入することで残存するMES bufferを丁寧に除去し、腸管の切れ目にゾンデを挿入した後、両端を結紮しclosed loopとした。37°C に加温した薬液 1 mL をゾンデを介してloop内に注入し、腸管は直ちに腹腔内へと戻した。実験中は白熱ランプを使用し、ラットの体温低下を防いだ。注入後、0.5, 5, 15, 30, 45, 60 分に薬液 20 μ L を回収した。

2-5-3. 薬液中の 3,4-DAP 濃度測定

loop 内の薬液の体積と薬液中の 3,4-DAP 濃度の積から loop 内の 3,4-DAP 量を求めた。0.5 分における loop 内の 3,4-DAP 量を基準として、各回収時間における 3,4-DAP の吸収率を求めた。HPLC の測定条件および測定方法については、2-1-3 に準ずる。

3. 統計処理

各データの検定は, Microsoft Excel を用いた対応のない t-検定により行なった。

参考文献

1. Lambert EH, Eaton LM, Rooke ED: Defect of neuromuscular conduction associated with malignant neoplasms, *Am J Physiol.* 1956; **187**: 612-613
2. Lambert EH, Elmqvist D: Quantal components of end-plate potentials in the myasthenic syndrome, *Ann N Y Acad Sci.* 1971; **183**: 183-199
3. O'Neill JH, Murray NM, Newsom-Davis J: The Lambert-Eaton myasthenic syndrome. A review of 50 cases, *Brain.* 1988; **111**(Pt 3)9: 577-596
4. Petty R: Lambert Eaton myasthenic syndrome, *Pract Neurol.* 2007; **7**: 265-267
5. Sanders DB: Lambert-Eaton myasthenic syndrome diagnosis and treatment, *Ann N Y Acad Sci.* 2003; **998**: 500-508
6. Motomura M, Lang B, Johnston I, Palace J, Vincent A, Newsom-Davis J: Incidence of serum anti-P/O-type and anti-N-type calcium channel autoantibodies in the Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *J Neurol Sci.* 1997; **147**(1): 35-42
7. Lennon VA, Kryzer TJ, Griesmann GE, et al.: Calcium-channel antibodies on the Lambert-Eaton syndrome antibody on presynaptic calcium channels in the mouse, *J Physiol.* 1987; **390**: 257-270
8. Sher E, Gotti C, Canal N, Scoppetta C, Piccolo G, Evoli A, Clementi F: Specificity of calcium channel autoantibodies in Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *Lancet.* 1989; **2**(8664): 640-643.
9. Wirtz PW, Smallegange TM, Wintzen AR, Verschuuren JJ: Differences in clinical features between the Lambert-Eaton myasthenic syndrome with and without cancer: an analysis of 227 published cases, *Clin Neurol Neurosurg.* 2002; **104**(4): 359-363
10. Titulaer MJ, Wirtz PW, Kuks JB, Schelhaas HJ, van der Kooi AJ, Faber CG, van der Pol WL, de Visser M, Sillevius Smitt PA, Verschuuren JJ: The Lambert-Eaton

- myasthenic syndrome 1988-2008: a clinical picture in 97 patients, *J Neuroimmunol.* 2008; **201-202**: 153-158
11. 矢部一郎,佐藤和則,宮崎雄生,辻幸子,佐々木秀直: Lambert-Eaton 筋無力症候群 3 例に対する 3,4-diaminopyridine 治療経験, *神経治療*.2006; **23**: 433-438
 12. 本村政勝: Lambert-Eaton 筋無力症候群—本邦 110 症例の検討, *臨床神経*. **39**, 1237-1239,1999
 13. 松島理明,矢口裕章,岸本利一郎,辻幸子,矢部一郎,佐々木秀直,中館恵,白石裕一, 本村政勝: 3,4-diaminopyridine が効果的であった肺小細胞癌合併 lambert-Eaton 筋無力症候群の 1 例, *日本内科学会雑誌*. 2007; **96**: 1709-1711
 14. Bever CT Jr, Leslie J, Camenga DL, Panitch HS, Johnson KP.: Preliminary trial of 3,4-diaminopyridine in patients with multiple sclerosis, *Ann Neurol.* 1990; **27**: 421-427
 15. Petty R: Lambert Eaton myasthenic syndrome, *Pract Neurol*, 2007; **7**: 265-267
 16. Ionno M, Moyer M, Pollarine J, van Lunteren E: Inotropic effects of the K⁺ channel blocker 3,4-diaminopyridine on fatigued diaphragm muscle, *Respir Physiol Neurobiol.* 2008; **160**: 45-53
 17. Judge SI, Bever CT Jr: Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment, *Pharmacol Ther.* 2006; **111**(1): 224-59
 18. Hong SJ, Chang CC: Facilitation by 3,4-diaminopyridine of regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve, *Br J Pharmacol.* 1990; **101**(4): 793-8
 19. Lindquist S, Stangel M: Update on treatment options for Lambert-Eaton myasthenic syndrome:focus on use of amifampridine, *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2011; **7**: 341-349

20. Lundh H, Nilsson O, Rosén I, Johansson S: Practical aspects of 3,4-diaminopyridine treatment of the Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *Acta Neurol Scand.* 1993; **88**: 136-140
21. McEvoy KM, Windebank AJ, Daube JR, Low PA: 3,4-diaminopyridine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *N Engl J Med.* 1989; **321**(23): 1567-1571
22. 上北久美, 石田卓, 佐藤俊, 菅原綾, 金沢賢也, 斎藤純, 平関根聡子, 石井妙子, 立原素子, 渡邊香奈, 谷野功典, 棟方充: 3,4-diaminopyridineが奏効した肺小細胞癌によるLambert-Eaton筋無力症候群の1例, *日呼吸会誌.* 2009; **47**(1)
23. Kostera-Pruszczyk A, Ryniewicz B, Rowinska-Marcinska K, Dutkiewicz M, Kamińska A: Lambert-Eaton myasthenic syndrome in childhood, *Eur J Paediatr Neurol.* 2009; **13**(2): 194-196
24. Sha SJ, Layzer RB: Myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome in the same patient, *Muscle Nerve.* 2007; **36**(1): 115-117
25. Sanders DB, Massey JM, Sanders LL, Edwards LJ: A randomized trial of 3,4-diaminopyridine in Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *Neurology.* 2000; **54**(3): 603-607
26. Wirtz PW, Verschuuren JJ, van Dijk JG, de Kam ML, Schoemaker RC, van Hasselt JG, Titulaer MJ, Tjaden UR, den Hartigh J, van Gerven JM: Efficacy of 3,4-diaminopyridine and pyridostigmine in the treatment of Lambert-Eaton myasthenic syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover study, *Clin Pharmacol Ther.* 2009; **86**(1): 44-48

27. Oh SJ, Claussen GG, Hatanaka Y, Morgan MB: 3,4-Diaminopyridine is more effective than placebo in a randomized, double-blind, cross-over drug study in LEMS, *Muscle Nerve*. 2009; **40**(5): 795-800
28. Sanders DB, Massey JM, Sanders LL, Edwards LJ: A randomized trial of 3,4-diaminopyridine in Lambert-Eaton myasthenic syndrome, *Neurology*. 2000; **8**: 54(3): 603-7
29. European Medicines Agency Product Information for Firdapse: Procedure No. EMEA/H/C/001032 -S/0016 (Last update 2013/4/16)
30. European Medicines Agency Evaluation of Medicines for Human Use: ASSESSMENT REPORT FOR Zenas: Procedure No. EMEA/H/C/001032, 2009
31. Goulay-Dufay S, Do B, Le Hoang MD, Raust JA, Graffard H, Guyon F, Pradeau D: Determination of A 3,4-diaminopyridine in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection using solid-phase extraction, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004; **805**: 261-266
32. 近野祐里: Lambert-Eaton 筋無力症候群治療薬 3,4-diaminopyridine のラットにおける薬物動態研究, 平成 20 年度金沢大学薬学部臨床薬剤学研究室 卒業論文
33. Kamari F, Nicholson E: Determination of 3,4-diaminopyridine in human plasma by high-performance liquid chromatography, *J Pharm Biomed Anal*, 1995; **13**: 791-794
34. Leslie J, Bever CT: Analysis of 3,4-diaminopyridine in human serum by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J Chromatogr*. 1989; **496**: 214-222
35. Flet L, Polard E, Guillard O, et al.: 3,4-diaminopyridine safety in clinical practice: an observational, retrospective cohort study. *J Neurol*. 2010; **257**: 937-946

36. Weimer MB, Wong J: Lambert-eaton myasthenic syndrome. *Curr Treat Options Neurol.* 2009; **11**: 77-84
37. Bever CT Jr, Leslie J, Camenga DL, Panitch HS, Johnson KP: Preliminary trial of 3,4-diaminopyridine in patients with multiple sclerosis, *Ann Neurol.* 1990; **27**: 421-427
38. Agundez J.A.G., Martinez C, Olivera M., Ledesma M.C., Ladero J.M., Bentez J.: Molecular analysis of the arylamine N-acetyltransferase polymorphism in a Spanish population, *Clin Pharmacol Ther.* 1994; **56**: 202-209
39. Cascorbi I, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I: Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity, *Am J Hum Genet.* 1995; **57**: 581-592
40. Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T: Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine N-acetyltransferase in human liver, *J Biol Chem.* 1990; **265**: 12757-12760
41. ASSESSMENT REPORT FOR Zenas: Procedure No. EMEA/H/C/001032. 2009
42. Igarashi T, Yano I: Decreased cyclosporine A concentrations in the absorption phase using microemulsion preconcentrate formulation in rats with cisplatin-induced acute renal failure, *Biol Pharm Bull.* 1993; **50**: 687-690